

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**ENCRUCIJADAS METABÓLICAS DEL OXALACETATO  
Y FOSFOENOLPIRUVATO EN EL HÍGADO Y  
REGULACIÓN DE LA GLUCOGÉNESIS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Roberto Marco Cuéllar**

Bajo la dirección del doctor  
Alberto Sois

**Madrid, 1971**

T30954

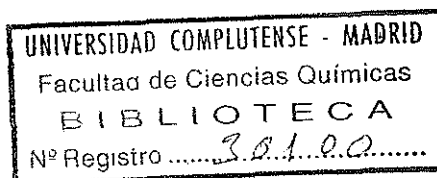
ENCRUCIJADAS METABOLICAS DEL OXALACETATO  
Y FOSFOENOLPIRUVATO EN EL HIGADO  
Y REGULACION DE LA GLUCONEOGENESIS

Tesis presentada para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

por el Licenciado en Ciencias Químicas

ROBERTO MARCO CUELLAR



Die Frage nach der Regulation dieses unerhört komplizierten Mechanismus (der Stoffwechsel der Kohlenhydrate) drängt sich auf. Hier greifen ausser und neben der Impulsübermittlung durch das Nervensystem die Hormone im Wege der Blutbahn ein und durch diese zweigeleisige Regulierung wird zunächst das Milieu, in dem sich die Prozesse des Auf- oder Abbaus abspielen, fein abgetönt oder tiefgreifend modifiziert. Das Zusammenspiel der Ionen, vor allen der des Wassers, ist in Verbindung mit allen korrelativen Erscheinungen, wie elektrischen Zell- und Membranpotentialen, Permeabilitätsänderungen usw., für den Stoffwechsel der Kohlenhydrate wie für jeden anderen von grundlegender Bedeutung. Doch können wir bekanntlich in eine betriebe physiologischer Prozesse nur dadurch Einblick gewinnen, dass wir störend in dasselbe eingreifen oder störende Prozesse, die sich ohne unser Zutun abspielen, beobachten...  
...Vielleicht wird in Zukunft eine...alles umspannende Theorie für den physiologischen und pathologischen Kohlenhydratstoffwechsel aufgestellt werden...Unser Bericht über die Chemie der Kohlenhydrate endet mit einem Fragezeichen -einem für viele! Die Wissenschaft von der Chemie der lebenden Materie ist eine lebendige Wissenschaft, und wenn nach dem Wort des Heraklit "alles fliesst", so fliesst dieses Gebiet unseres Denkens und Suchens mit besonderen Ungestüm dahin.

Lieben, F. Geschichte der physiologischen Chemie, Leipzig und Wien, 1935, p. 527 y 538.

A Maria Emilia



Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Enzimología del C.S.I.C. bajo la dirección del Dr. Alberto Sols.

Debo agradecer al Dr. Sols su ayuda y consejos a lo largo de la realización de esta tesis; su instinto científico y su elevado espíritu crítico han dejado una huella imborrable en mi formación bioquímica. Junto a él todos los miembros del Instituto han contribuido a crear un ambiente científico y un clima de amistad en el que se ha desarrollado mi labor en estos últimos cuatro años. En particular debo nombrar por su ayuda constante y su estrecha colaboración conmigo a Antonio Sillero, que me ayudó en la iniciación de este trabajo, a Angel Pestaña, Pilar Llorente, Jesús Sebastián, Carmen G. Vallejo y Juan Carbonell. Reconozco mi deuda con Pilar Estévez, Amelia Nieto y Lorenzo Seguido cuya eficaz ayuda técnica han sido decisivas para mi trabajo. Last but not least, este trabajo existe gracias a la colaboración y amistad de Clotilde Estévez.

Al Prof. A.M. Municio debo agradecer sus sugerencias y crítica del manuscrito así como haber aceptado ser ponente de esta tesis.

*Roberto Marco*

## INDICE

Abreviaturas . . . . .	1
I. INTRODUCCION . . . . .	2
II. MATERIAL Y METODOS . . . . .	12
1. Animales y tratamiento . . . . .	13
2. Aparatos . . . . .	14
3. Productos . . . . .	15
4. Métodos . . . . .	16
Obtención de extractos y fraccionamiento . . . . .	16
Valoraciones enzimáticas . . . . .	17
III. RESULTADOS . . . . .	27
1. <u>Bases enzimáticas de las encruclizadas metabólicas del oxalacetato y fosfoenolpiruvato</u> . . . . .	28
2. <u>Enzimas de la encruclizada mitocondrial del oxalacetato</u> . . . . .	55
A. Variación en la actividad de los enzimas . . . . .	55
B. La piruvato carboxilasa como enzima anaplerótico . . . . .	59
C. Propiedades cinéticas de la citrato sintasa en relación con la encruclizada del oxalacetato . . . . .	61
D. Propiedades cinéticas de la malato deshidrogenasa mitocondrial . . . . .	66
E. Propiedades cinéticas de la glutámico oxalacético transaminasa mitocondrial . . . . .	74
3. <u>Enzimas de la encruclizada citoplasmática del oxalacetato</u> . . . . .	79
A. Variación de la actividad de los enzimas . . . . .	79
B. Propiedades cinéticas de la malato deshidrogenasa citoplasmática . . . . .	81
C. Propiedades cinéticas de la glutámico oxalacético transaminasa citoplasmática . . . . .	81
D. Propiedades cinéticas de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa . . . . .	90
4. <u>La encruclizada del fosfoenolpiruvato y la piruvato kinasa</u> . . . . .	96
A. Variación en el hígado de la actividad de los enzimas . . . . .	96
B. Propiedades cinéticas de la piruvato kinasa de hígado . . . . .	99
C. Propiedades cinéticas de la piruvato kinasa de riñón . . . . .	109

IV. DISCUSION . . . . .	113
<u>Las encruclijadas metabólicas del oxalacetato y del</u> <u>fosfoenolpiruvato</u> . . . . .	115
<u>Regulación de las encruclijadas del oxalacetato</u> . . . . .	120
La encruclijada mitocondrial . . . . .	127
La encruclijada citoplasmática . . . . .	136
<u>Regulación de la encruclijada del fosfoenolpiruvato</u> . . . . .	144
<u>Regulación conjunta de la gluconeogénesis y</u> <u>procesos metabólicos relacionados</u> . . . . .	153
<u>Niveles superiores de Integración metabólica</u> . . . . .	158
V. CONCLUSIONES . . . . .	161
VI. BIBLIOGRAFIA . . . . .	164

## ABREVIATURAS

AcCoA	acetil coenzima A
AcDPN	acetil piridín DPN
ADP	adenosín difosfato
AMP	5' adenosín monofosfato
AMPc	3',5' adenosín monofosfato cíclico
ASP	aspartato
ATP	adenosín trifosfato
CoA	coenzima A
1,3 DPG	1,3 difosfoglicerato
DPN	difosfo piridín nucleótido, forma oxidada
DPNH	difosfo piridín nucleótido, forma reducida
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FDP	fructosa 1,6 difosfato
F6P	fructosa 6 fosfato
GDP	guanosín difosfato
GLU	glutamato
GIP	glucosa 1 fosfato
G6P	glucosa 6 fosfato
GTP	guanosín trifosfato
IDP	inosín difosfato
ITP	inosín trifosfato
$\alpha$ KG	$\alpha$ cetoglutarato
Km	constante de Michaelis
Mal	malato
OA	oxalacetato
PEP	fosfoenolpiruvato
3PG	3 fosfoglicerato
PI	fosfato inorgánico
TP	triosas fosfatos
TPN	trifosfo piridín nucleótido, forma oxidada
TPNH	trifosfo piridín nucleótido, forma reducida
UDPG	uridín difosfo glucosa.

## I. INTRODUCCION

Se conoce con el nombre de gluconeogénesis el proceso metabólico por el cual se sintetiza glucosa a partir de residuos carbonados no glicídicos. Este proceso en los organismos <sup>S</sup>celulares <sup>una</sup> tiene una significación estrictamente limitada a la propia célula dirigida fundamentalmente a la síntesis de ciertos compuestos necesarios para ella misma, como son los ácidos nucleicos y polisacáridos estructurales y en un segundo plano permitiendo la acumulación de ciertos polisacáridos de reserva. En los organismos superiores este proceso se hace más complejo debido a que la diferenciación de las funciones de los diferentes órganos y tejidos convierte a la gluconeogénesis en un proceso metabólico de una significación eminentemente interorgánica, pasando a un segundo lugar su posible importancia para la propia célula. La existencia de ciertos tejidos como el sistema nervioso y los eritrocitos que dependen casi exclusivamente (al menos en una primera fase) del consumo de la glucosa sanguínea, convierten a la regulación de la glucemia en uno de los procesos básicos y centrales de la integración metabólica de un organismo superior.

El hígado es el órgano metabólico principal del cuerpo. Además de muchas otras funciones, juega un papel de primer orden en el metabolismo de los hidratos de carbono. En condiciones de alimentación normal los hidratos de carbono que no son utilizados directamente por los órganos y tejidos son almacenados por el hígado en forma de glucógeno o transformados en grasas por el hígado y el tejido adiposo. De esta forma la reserva energética del organismo queda dividida en dos compartimientos, uno más



rápídamente movillizable, en forma de glucosa, que es el formado por el glucógeno hepático y otro formado por la grasa. Sin embargo la existencia ya indicada de tejidos dependientes casi exclusivamente del metabolismo de la glucosa, exige la puesta en marcha de un proceso de producción de glucosa una vez exhausta la reserva de glucógeno hepático.

El extraordinario empuje dado en las décadas de los 30 y los 40 al estudio de la base enzimática del metabolismo de los hidratos de carbono tiene su corolario en la identificación en el hígado de unos enzimas específicos: glucosa 6 fosfatasa (39, 147), fructosa 1,6 difosfatasa (48), fosfoenolpiruvato carboxikinasa (161), y piruvato carboxilasa (159, 160) que van a permitir comprender cómo se produce la síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos (76). En los órganos gluconeogénicos existirán pues tres clases de enzimas (Figura 1): a) enzimas que catalizan reacciones termodinámicamente muy desplazadas en la dirección del flujo glicolítico y por tanto fisiológicamente irreversibles: glucokinasa, fosfofructokinasa y piruvato kinasa; b) enzimas que catalizan reacciones que bien aisladamente o en su conjunto están termodinámicamente poco desplazadas y se consideran bidireccionales; y c) enzimas que catalizan reacciones antagónicas a las del primer grupo pero con un mecanismo distinto que las convierte también en fisiológicamente irreversibles. Son los enzimas gluconeogénicos mencionados anteriormente.

En los tejidos animales no existen sistemas enzimáticos tales como los presentes en bacterias y plantas capaces de producir síntesis neta de hidratos de carbono a partir de residuos de dos carbonos. Esto excluye a los productos de oxidación de los ácidos grasos como precursores gluconeogénicos con la excepción de los

de 3 átomos de carbono. Sin embargo, los órganos gluconeogénicos, en particular el hígado, obtienen la energía necesaria para su mantenimiento y para las biosíntesis de productos requeridos por otros tejidos, de la oxidación de ácidos grasos, proceso metabólico que está produciéndose por tanto simultáneamente a la gluconeogénesis. Los principales precursores de la glucosa son: a) productos de la degradación de la misma en otros tejidos, tales como el piruvato y lactato, b) aminoácidos gluconeogénicos, c) el glicerol proveniente de las grasas y d) otros carbohidratos tales como la fructosa, galactosa, etc. que eventualmente pueden llegar en la dieta, que se metabolizan por vías especiales y que ingresan en distintos puntos de la secuencia gluconeogénica. Aunque estos últimos precursores son muy interesantes como posibles nutrientes o para ser utilizados como tests específicos de la importancia de ciertos mecanismos de regulación operativos a determinados niveles de la secuencia gluconeogénica (141), su importancia en condiciones fisiológicas es de un segundo orden, lo que justifica que no insistamos demasiado en ellos. Por otra parte, tanto ellos como el glicerol proveniente de las grasas entran en gluconeogénesis a nivel de los triosas fosfato (ver Figura 1) lo que los pone fuera de la zona metabólica a cuyo estudio está dedicada esta tesis.

Como hemos señalado anteriormente, el proceso gluconeogénico es un proceso metabólico eminentemente interorgánico, por lo que los procesos de permeabilidad y transporte juegan un papel esencial a la hora de decidir qué compuestos de entre todos los metabólicamente capaces son realmente precursores importantes de la glucosa producida de novo en el hígado. Eso explica la anterior subdivisión de precursores y produce importantes diferencias entre





los diferentes aminoácidos gluconeogénicos en su capacidad de ser precursores de glucosa. Por supuesto esto no afecta a la capacidad endógena de hacer glucosa, pero sí a la capacidad de utilización de derivados provenientes de otros tejidos.

El conocimiento creciente conseguido en los últimos años en el campo del metabolismo intermedio permite intentar el abordaje del funcionamiento cuantitativo de todos estos procesos y vías metabólicas. Esto se refleja en la importancia cada vez mayor concedida hoy a los estudios de regulación y control metabólicos. En una primera fase semicuantitativa se ha concretado en la identificación y estudio de determinadas propiedades de presunto carácter regulador que han dado una nueva "dimensión" a los estudios enzimológicos clásicos. Sin embargo, para dar un nuevo paso adelante hay que pasar a la elaboración de modelos cuantitativos capaces de describir (y predecir) el comportamiento bioquímico de las células y organismos vivos. En realidad, a pesar de los mencionados avances en nuestro conocimiento, estamos aún lejos de poder formular un modelo cuantitativo como el indicado. ¿Cuáles son las principales dificultades existentes en esta tarea? A nuestro juicio son tres las más importantes: 1ª la insuficiencia de nuestros conocimientos. Si bien es mucho lo que hemos avanzado en los últimos años, no hay duda de que todavía desconocemos muchas cosas importantes, quizás claves, para la elaboración de un modelo cuantitativo de un ser vivo. Esto no sólo se refiere a determinadas propiedades o piezas del modelo actualmente desconocidas, sino a la falta de una teoría general que interprete la situación físicoquímica especial reinante en el protoplasma celular. Algunos de estos problemas se discuten con mayor extensión por Sols y Marco (140). 2ª La dificultad de la extrapolación de los resultados obtenidos in vitro a la situación in

vivo. En la mayoría de las propiedades en cuyo estudio se ha podido profundizar esto ha sido posible gracias a estudios in vitro. Hoy en día parece claro que no todas las propiedades de presunto papel regulador pueden tener valor in vivo. El problema estriba en saber cuáles son las que no tienen valor y cuáles sí, o dicho de otro modo, en poder valorar la importancia que puede tener para la aparición o desaparición de determinadas propiedades o efectos el paso de las condiciones reinantes en el interior de la célula viva a condiciones empleadas in vitro. 3ª Si bien es posible tratar de trabajar con sistemas más complejos, por ejemplo células intactas o en los organismos superiores, animal entero, órganos perfundidos, cortes de órganos, etc., la realidad es que la información que suministran es también compleja e inanalizable sin hacer uso de determinadas suposiciones no siempre bien fundamentadas.

En el presente estudio vamos a intentar profundizar en los problemas planteados desde el punto de vista de la elaboración de un modelo semicuantitativo del metabolismo intermediario en organismos superiores a nivel de una zona de una importancia metabólica capital: el triángulo metabólico formado por las encrucijadas del oxalacetato, fosfoenolpiruvato y piruvato. A este nivel (Figura 1) entran en relación la vía principal del metabolismo glicídico con las de biosíntesis y degradación de los ácidos grasos, los productos de interconversión de los principales aminoácidos, los de eliminación del nitrógeno (ureogénesis) y la principal maquinaria energética celular: el ciclo de Krebs acoplado a la fosforilación oxidativa. La importancia fundamental de todos estos procesos es sobradamente conocida para no tener que insistir en ella aquí.

Para la elaboración de cualquier modelo de funcionamiento

metabólico tras la identificación de los pasos enzimáticamente catalizados es necesario un estudio de su compartimentación, es decir, el análisis de si todas estas reacciones ocurren en el mismo compartimiento metabólico o no. Naturalmente la compartimentación que se puede poner de manifiesto depende muy directamente de la metodología empleada y del grado de diferenciación que ésta permita. En el libro de Roodyn, Enzyme Cytology (120) se realiza una crítica bastante equilibrada de estos métodos. Algunas limitaciones dependen simplemente de la compartimentación intercelular de determinados enzimas como es el caso de la hexokinasa y glucokinasa de hígado de rata (123). En otros casos (86, 157) la evidencia de la existencia de una compartimentación más fina y difícilmente analizable con las técnicas actuales de fraccionamiento proviene de experimentos que utilizan isótopos radioactivos. En ellos se aprecian diferencias en actividades específicas de diferentes intermediarios sólo explicables por la existencia de distintos "pools" intracelulares. Sin embargo, esta interpretación de los hechos experimentales depende muchas veces de suposiciones no siempre completamente seguras y en todo caso la crítica fundamental a estos trabajos es que conducen en general a un callejón sin salida. Sólo será verdaderamente valiosa una hipótesis de compartimentación, postulada como resultado de estos experimentos, cuando conduzca a un modelo concreto que se pueda verificar por otros métodos alternativos y que permita predecir el comportamiento del sistema en otras condiciones diferentes a las que lo originaron. Hasta que esto ocurra queda sólo como una posibilidad a tener simplemente en cuenta.

Una vez establecida la compartimentación de una vía metabólica y las vías relacionadas, se puede pasar al estudio de su



regulación. Desde un punto de vista general, en una secuencia de reacciones, aquélla o aquéllas que permiten un control más estricto del flujo total del sistema son las limitantes, es decir, aquéllas en las que un cambio más pequeño produce mayor repercusión en el flujo total. Esto a nivel de una secuencia de enzimas supone que las reacciones catalizadas por enzimas de actividad no muy elevada, que se encuentran lejos de equilibrio, por tanto irreversibles, y que están en el comienzo de una vía o tras una ramificación o encrucijada son los candidatos óptimos de regulación.

¿Qué mecanismos producirán esa regulación? En la actualidad se conciben dos niveles susceptibles de regulación más o menos coordinada: a) concentración del enzima regulado y b) actividad del mismo. Los mecanismos a nivel molecular que explican el control de la concentración de enzimas están considerablemente estudiados en algunos microorganismos como E. coli (64, 35) pero no tanto en los organismos superiores (125). En éstos se piensa que la concentración es un equilibrio entre la velocidad de síntesis y degradación, pero los mecanismos que los controlan, especialmente al proceso de degradación están en una fase muy inicial de estudio. El control de actividad de un enzima puede ser específico, mediante activadores, inhibidores o respuestas alostéricas (73) o más inespecífico por acción de análogos inhibidores competitivos, etc. Junto a estos dos modos generales de regulación, existe un tercero, a caballo entre los dos, que es el de los enzimas que pueden existir en dos (o más) formas interconvertibles, de actividad y otras propiedades diferentes (63).

En nuestro intento de formular la regulación de la zona metabólica formada por el triángulo metabólico piruvato-oxalacetato-

fosfoenolpiruvato no hemos profundizado en los mecanismos moleculares de los modos generales de regulación mencionados en el párrafo anterior, pero sí hemos seguido unos abordajes experimentales que permitiesen detectar su posible existencia. Así se ha examinado sistemáticamente la posible existencia de cambios de concentración de los enzimas implicados mediante su ensayo en condiciones óptimas (y por tanto proporcional a su concentración), en condiciones de flujo glicolítico y en condiciones gluconeogénicas. Del mismo modo se emprendió el estudio de las propiedades cinéticas de presunto papel regulador de estos enzimas. Este estudio se hizo siempre que fue posible en condiciones de pH, concentración de sustratos y otros productos más o menos inespecíficos, etc. lo más cercanas posibles a las que presumiblemente existen en la célula. Para ello en varios casos se han desarrollado métodos específicos de ensayo de algunos enzimas capaces de poder minimizar la diferencia entre las condiciones in vitro e in vivo. Aunque esto es sólo un desideratum inalcanzable totalmente, ha sido ésta una preocupación constante a lo largo de nuestro trabajo. Se han tratado de encontrar en particular electos y electores alostéricos por su mayor importancia desde un punto de vista regulador.

De acuerdo pues con lo dicho hemos dividido en cuatro partes la sección de resultados:

1. Bases enzimáticas de las encrucljadas metabólicas del oxalacetato y del fosfoenolpiruvato en hígado.
2. Enzimas de la encrucljada mitocondrial del oxalacetato.
3. Enzimas de la encrucljada citoplasmática del oxalacetato.
4. La piruvato kinasa y la encrucljada del fosfoenolpiruvato en hígado.

Las tres últimas secciones están divididas en: Una parte

en que se exponen los cambios en las actividades óptimas de los enzimas y otra en que se detallan las propiedades cinéticas de los diferentes enzimas.

Finalmente, los efectos y propiedades encontrados se discuten globalmente con el fin de tratar de formular un modelo del funcionamiento in vivo de esta importante área metabólica.

## II. MATERIAL Y METODOS



### 1. Animales y tratamiento

Para los experimentos se utilizaron ratas blancas de raza Wistar provenientes de los criaderos del Instituto Gregorio Marañón (Centro de Investigaciones Biológicas) alimentadas con una dieta normal standard adquirida en Plensos Españoles, S.A.

Normalmente se utilizó como estado gluconeogénico tipo el ayuno de 48 horas. En el caso concreto de la utilización de las dietas hiperproteica y rica en glucosa, la composición de la dieta fue la siguiente:

La dieta de glucosa al 90% contenía: glucosa 890 g, aceite vegetal 50 g, sales 40 g y mezcla de vitaminas y caseína 20 g. En la dieta hiperproteica la glucosa fue sustituida por caseína sin vitaminas. La mezcla de vitaminas y caseína contenía lo siguiente: tiamina HCl, 500 mg; riboflavina, 188 mg; piridoxina HCl, 500 mg; ácido nicotínico, 1,88 g; pantotenato cálcico, 1,3 g; menadiona (2 metil-1,4-naftoquinona) 250 mg; ácido fólico, 50 mg; vitamina B<sub>12</sub> (cristalina), 5 mg; biotina, 10 mg; y colina HCl, 15 g. Esta dieta es similar a la utilizada por Pitot (106).

En cualquiera de los experimentos y tratamientos los animales tuvieron libre acceso al agua.

También se emplearon en algunos experimentos conejos que provenían del criadero de la firma Eufrasio García, c/Jenara Gómez, 7, Madrid-19.

## 2. Aparatos

Las medidas enzimáticas en el espectrofotómetro se hicieron empleando cubetas apropiadas (Corex para el visible y cuarzo para el U.V.) de 1 cm de paso de luz en un espectrofotómetro Cary 15 y Beckman DB con registrador automático o en un Coleman Autoset.

Para el estudio cinético de la málico deshidrogenasa se empleó el "ratio fluorometer" Beckman modelo 7720.

Para las colorimetrías se usó un fotocolorímetro Klett-Summerson.

Las medidas de pH se hicieron con un potenciómetro Pusi y un pHmetro de escala expandida Metrohm Herisan modelo E300B.

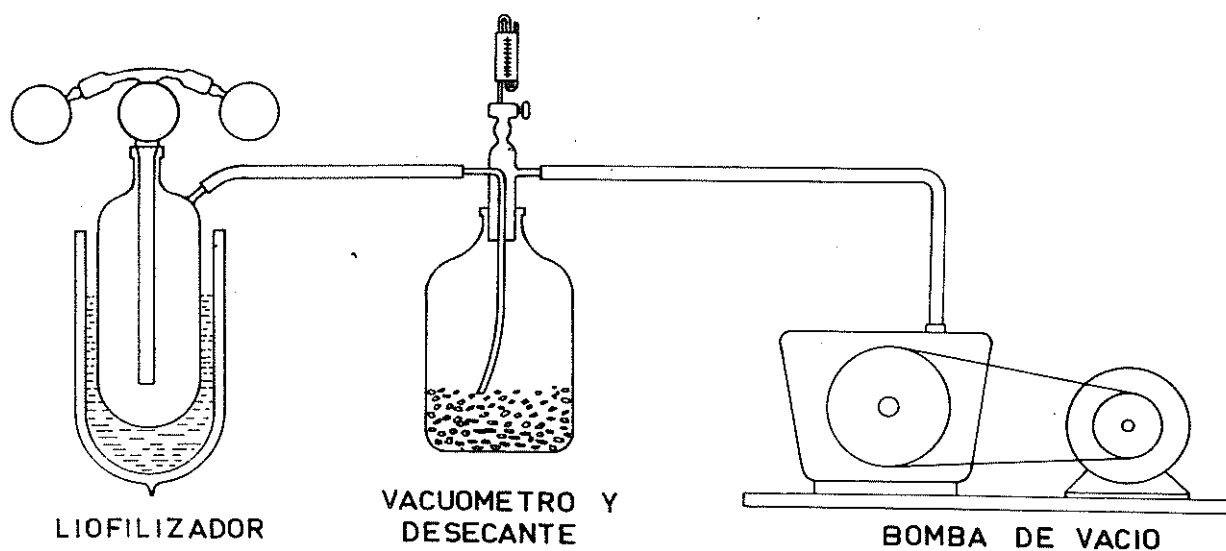
Las homogenizaciones se hicieron empleando un Kontes-Duall Grinder.

Las centrifugaciones a pequeña velocidad se hicieron usando una centrífuga Wifug Doctor y para las velocidades mayores una supercentrífuga Sorvall RC-2 y la ultracentrífuga preparativa Spinco L (con el rotor 40 para las centrifugaciones simples y el rotor SW-25 para los gradientes de sacarosa).

Para el tratamiento con ultrasonidos se empleó un Branson Sonic Power Sonifier.

Las liofilizaciones se llevaron a cabo en un liofilizador (véase esquema adjunto en la Figura 2) con una mezcla de acetona-nieve carbónica para el foco frío y una bomba de vacío (P.S.T. modelo FD 47-36 del Instituto Torres Quevedo del CSIC) acoplada.

Para las medidas de radioactividad se utilizó un contador de flujo de metano Friesseke Hoepfner y un contador de centelleo líquido Tricarb Packard de tres canales.



**Fig. 2. Esquema del liofilizador.** La muestra convenientemente congelada se coloca en los balones y el loco frío del liofilizador se obtiene con una mezcla de acetona-nieve carbónica.

### 3. Productos

#### Sustratos y coenzimas.

Sigma: acetil-CoA, acetil piridín DPN, ácido DL isocitrónico, ADP, AMP, ATP, benzilamina,  $\alpha$  cetoglutarato sódico, fosfoenolpiruvato, GDP, GTP, fructosa difosfato, glucosa 6 fosfato,  $\beta$  glicerofosfato sódico, IDP, ITP, piridoxal fosfato, piruvato sódico y TPNH.

Boehringer: citocromo c, DPNH, 2 fosfoglicerato sódico, TPN, fructosa 6 fosfato.

Calbiochem: L-alanina, ácido oxalacético.

Eastman Kodak: ácido L glutámico, ácido úrico.

Merck: ácido L aspártico, ácido L málico.

Sustratos radioactivos: ácido aspártico- $^{14}\text{C}$ (U) (Amersham R.C.) y bicarbonato sódico- $^{14}\text{C}$  (J.E.N.).

#### Enzimas auxiliares.

Boehringer: fosfohexosa isomerasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, glutámico oxalacético transaminasa, piruvato kinasa, hexokinasa, láctico deshidrogenasa y malato deshidrogenasa.

Sigma: citrato sintasa.

#### Otros productos.

Sigma: dilitceritritol, ácido ascórbico, imidazol y Tris.

Merck: EDTA (Titriplex III), fosfato potásico (mono y di), cloruro potásico, cloruro magnésico, cloruro de manganeso (II), butanol secundario, amoníaco, cloruro potásico, acetato sódico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido maléico.



Calbiochem: glutatión reducido.

Schuchardt: caseína y tolueno

Riedel: trietanolamina. Room & Haas: Tritón.

Planstiehl: D-glucosa y sacarosa. Fisher: ácido fórmico y acetona. May & Baker: molibdato amónico. Packard: 2,5-difeniloxazol y dimetil-2,2-p-fenilenbis(5-feniloxazol). Carlo Erba: propanol. N.B.C.: mezcla vitamínica para las dietas. Probus: bicarbonato sódico. Panreac: cloruro cálcico. F.A.E.S.: glucosa para las dietas.

#### 4. Métodos

##### Obtención de extractos y fraccionamientos

Las ratas se mataron por decapitación, se les extrajo el hígado que se homogenizó en un Kontes-Duall Grinder con dos o tres veces su peso de una mezcla isotónica que contenía sacarosa 0,25 ó 0,3 M según los casos. En ciertos experimentos se empleó el medio de homogenización de Seubert que está constituido por trietanolamina HCl 0,1 M, pH 7,2 y sacarosa 0,25 M, en la proporción 2 a 8, EDTA 1 mM y glutatión 1 mM o un medio salino isotónico formado por: fosfato potásico 5 mM, pH 7; dilitioeritrítol 1 mM; KCl 0,15 M; NaHCO<sub>3</sub> 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM; MnCl<sub>2</sub> 0,05 mM.

A fin de minimizar la rotura de los distintos orgánulos celulares se homogenizó durante 1 minuto. Después de pasar el homogenizado a través de un filtro de tela para eliminar los restos tisulares que han resistido a la homogenización se sometieron a los distintos métodos de fraccionamiento que se describen detalladamente en la sección de resultados.

### Valoraciones enzimáticas

Adenilato kinasa (E.C. 2.7.4.3). Se empleó un método semejante al descrito por Sottocasa y col. (141). La mezcla de valoración consistía en Tris HCl 40 mM, pH 7,5,  $MgCl_2$  5 mM, ADP 5 mM, TPN 0,4 mM, glucosa 1 mM, hexokinasa de levadura 1 unidad y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 1 unidad, en un volumen final de 1 ml. Se agotaba inicialmente el ATP que llevaba el ADP y se disparaba la reacción añadiendo la preparación enzimática midiendo la aparición de TPNH a 340 nm.

Citocromo oxidasa (E.C. 1.9.3.1). Se empleó el método de Wharton y Tzagoloff (169). La mezcla de valoración en un volumen final de 1 ml consistía en: tampón fosfato potásico 20 mM pH 7, citocromo c reducido 0,07 mM, y cantidades apropiadas de preparación enzimática (del orden de 0,01 U). El citocromo c se reducía previamente con ácido ascórbico. La reacción se seguía viendo la disminución de absorción a 550 nm.

Citrato sintasa (E.C. 4.1.3.7). Se empleó generalmente el método radioactivo desarrollado por nosotros, que se estudia detalladamente en los resultados de esta tesis (Resultados 2.C) y en cuya mezcla de reacción intervienen los siguientes componentes en 0,25 ml de volumen final: tampón imidazol HCl 40 mM, pH 7; aspartato sódico 0,1 mM, aspartato- $^{14}C$  uniformemente marcado 300.000 dpm,  $\alpha$  cetoglutarato sódico 0,1 mM, glutámico oxalacético transaminasa 5 unidades internacionales, acetil-CoA 0,16 mM, Tritón al 0,4% y enzima en cantidad apropiada. Como blanco se llevó un tubo sin acetil-CoA o sin  $\alpha$  cetoglutarato. La reacción se detiene con 25  $\mu$ l de HCl 5 N. Se centrifugan los

tubos para separar las proteínas precipitadas y el sobrenadante se cromatografía sobre papel Whatman nº 1 en una sola dimensión usando los eluyentes descritos por Metzner (88) bien el eluyente ácido (sec-butanol, ac. fórmico, agua 60/10/20) o el básico (n propanol-amoniaco concentrado-agua 60/30/10). La tira de papel se recorta en trozos pequeños (de 1 ó 1/2 cm de longitud) y la radioactividad se cuenta en un contador de centelleo líquido usando una mezcla formada por 2,5-difenil-oxazol y dimetil 2,2-p-fenileno bis(5-feniloxazol) en la proporción de 10 a 1 ("Premix") 5,5 g/litro, según la técnica descrita por Davidson (28).

Ocasionalmente se usó un método semejante al descrito por Ochoa (95). La mezcla de ensayo en un volumen de 1 ml estaba compuesta por: tampón imidazol HCl 50 mM, pH 7, malato sódico 2 mM, DPN 0,5 mM, mállico deshidrogenasa 5 unidades, acetil-CoA 0,1 mM y enzima en cantidad apropiada. Como blanco se llevó una cubeta sin acetil-CoA. Se seguía el aumento de absorción a 340 nm.

DPNH citocromo c reductasa (E.C. 1.6.2.1) (rotenona sensible e insensible). Se empleó un método semejante al descrito por Sottocasa *et al.* (142). La mezcla de ensayo en un volumen de 1 ml estaba compuesta por: tampón fosfato potásico 20 mM pH 7, EDTA 0,5 mM, KCN 1 mM, citocromo c oxidado 0,7 mM, DPNH 0,3 mM y cantidad apropiada de extracto. La reacción se seguía viendo el aumento de absorción a 550 nm con una cubeta como blanco sin DPNH. Cuando se quería determinar el enzima insensible a la rotenona, la muestra enzimática se trataba durante 10 minutos a partes iguales con una dilución al 10% de una

solución alcohólica de rotenona al 10%. El enzima sensible a la rotenona se calculaba por diferencia entre la actividad total y la insensible.

Enolasa (E.C. 4.2.1.11). Se usó un método acoplado a la piruvato kinasa. La mezcla de reacción de 1 ml de volumen total estaba compuesta por tampón Imidazol HCl 50 mM, pH 7, KCl 0,1 M,  $MgCl_2$  5 mM, ADP 1 mM, DPNH 0,15 mM, piruvato kinasa 0,5 unidades, láctico deshidrogenasa 0,5 unidades y cantidad apropiada de extracto. El ensayo se empezaba con la adición de 2-fosfoglicerato sódico suficiente para una concentración final de 5 mM y se medía viendo la disminución de la absorción a 340 nm. Se llevaron cubetas como blanco sin 2-fosfoglicerato ó ADP.

Fosfatasa ácida (E.C. 3.1.3.2). Se utilizó el método de Gianetto y De Duve (44). La mezcla de reacción contenía en 0,5 ml: acetato sódico 50 mM, pH 5,  $\beta$ -glicerofosfato sódico 50 mM y preparación enzimática. La reacción se detenía añadiéndose 1 ml de ácido tricloroacético y el fósforo se medía por el método de Bernhart y Wreath (11) en el sobrenadante después de separar las proteínas precipitadas por centrifugación. La mezcla de ensayo contenía en 5 ml: 0,4 ml de molibdato amónico al 3,8% en  $H_2SO_4$  10 N, la muestra que contiene fósforo y 2 ml de acetona y el color amarillo se lee a 420 nm en un fotocolorímetro.

Fosfoenolpiruvato carboxikinasa (E.C. 4.1.1.32).

a) en reverso: Se valoró con un método semejante al descrito por Chang y Lane (24). La mezcla de reacción contenía en 0,5 ml de volumen final: tampón Imidazol HCl 80 mM,



pH 7, glutation 5 mM,  $\text{NaHCO}_3$ - $^{14}\text{C}$  50 mM (1.500.000 cpm), fosfoenolpiruvato 5 mM, GDP 1,6 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{MnCl}_2$  0,5 mM, glutamato sódico 15 mM, glutámico oxalacético transaminasa 1 unidad y cantidad apropiada de enzima. La reacción se detiene con 50  $\mu\text{l}$  de HCl 5 N, se centrifuga a 5000 rpm durante cinco minutos y el sobrenadante se pipetea en planchetas donde después de secado se cuenta la radioactividad ácido estable. Se lleva un blanco sin GDP.

En el caso de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa particulada también se empleó un método espectrofotométrico acoplado a la málico deshidrogenasa semejante al descrito por Chang y Lane (24). La mezcla de reacción estaba compuesta en 1 ml por: tampón imidazol HCl 50 mM, pH 7, glutation 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{MnCl}_2$  5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  50 mM, fosfoenolpiruvato 5 mM, GDP 2 mM, málico deshidrogenasa 1 unidad, DPNH 0,1 mM y cantidad apropiada de extracto. La actividad se midió siguiendo la disminución de absorción a 340 nm después de restar un blanco sin  $\text{NaHCO}_3$ .

b) en directo: Se empleó un método a base de isótopos radioactivos, desarrollado por nosotros y que se estudia detalladamente en la sección de resultados (3.D). La mezcla de reacción habitualmente estaba compuesta, en un volumen final de 0,25 ml, por los siguientes reactivos: imidazol HCl 80 mM, pH 7, glutation 4 mM, aspartato sódico 2 mM, aspartato- $^{14}\text{C}$  uniformemente marcado (300.000 dpm),  $\alpha$  cetoglutarato 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  6 mM,  $\text{MnCl}_2$  0,4 mM, ITP (ó GTP) 4 mM, glutámico oxalacético transaminasa 5 unidades y preparación enzimática. En el caso de querer variar la concentración de oxalacetato se cambian

adecuadamente las concentraciones de aspartato (manteniendo el número de cuentas) y  $\alpha$  cetoglutarato. La reacción se detiene añadiendo 25  $\mu$ l de HCl 5 N, se centrifuga para separar las proteínas precipitadas y el sobrenadante se cromatografía sobre papel con el eluyente básico de Metzner (88) de modo semejante al descrito para la citrato sintasa.

c) reacción de intercambio: Se empleó un método semejante al descrito por Felicioli y col. (41). La mezcla de reacción en 0,5 ml estaba compuesta por los siguientes reactivos: imidazol HCl 80 mM, pH 7, glutatión 5 mM,  $\text{NaHCO}_3$ - $^{14}\text{C}$  5 mM (1.500.000 dpm),  $\text{MgCl}_2$  4 mM,  $\text{MnCl}_2$  0,4 mM, ITP (ó GTP) 2 mM, oxalacetato 2 mM y la preparación enzimática. La reacción se detiene con EDTA pH 7, 10 mM y el oxalacetato- $^{14}\text{C}$  se fija en una segunda etapa con glutamato 15 mM y glutámico oxalacético transaminasa 1 unidad. Después de añadir 50  $\mu$ l de HCl 5 N y centrifugar para separar las proteínas precipitadas, el sobrenadante se pipetea en plancheta de acero, se deseca y la radioactividad ácido estable se cuenta en un contador de flujo de metano.

Fosfoglucosa isomerasa (E.C. 5.3.1.9). Se empleó un método acoplado a glucosa 6 fosfato deshidrogenasa utilizando el fundamento descrito por Stein (138). La mezcla de reacción contenía en 1 ml: imidazol HCl 50 mM, pH 7, fructosa 6 fosfato 0,5 mM, TPN 0,5 mM, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 1,4 unidades y preparación enzimática. La reacción se seguía viendo el aumento de absorción óptica a 340 nm con un blanco al que no se le añade fructosa 6 fosfato.

Fructosadifosfatasa (E.C. 3.1.3.11). Se empleó un método semejante al descrito por Sillero y col. (135). La mezcla

de reacción contenía en 1 ml: imidazol HCl 50 mM, pH 7, KCl 0,1 M,  $MgCl_2$  5 mM, fructosa difosfato 0,1 mM, TPN 0,5 mM, glucosa 6 fosfato isomerasa 1,5 unidades, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 1 unidad y preparación enzimática. La reacción se sigue viendo el aumento en la absorción óptica a 340 nm, con un blanco sin fructosa difosfato.

Glucosa 6 fosfatasa (E.C. 3.1.3.9). Se empleó un método semejante al descrito por Nordlie y Arion (93). La mezcla de reacción consistía en 0,5 ml de tampón maleato sódico 50 mM, pH 6,9, glucosa 6 fosfato 10 mM y preparación enzimática. La reacción se detiene con 1 ml de tricloroacético al 12% y el fósforo liberado se mide con el método de Bernhart y Wreath (11).

Glutámico deshidrogenasa (E.C. 1.4.1.3). Se empleó un método semejante al descrito por Williamson y colaboradores (173). La mezcla de reacción contenía en 1 ml: tampón Tris HCl 50 mM pH 7,8, Tritón al 0,1%, dilitioeritritol 1 mM, EDTA 1 mM, MgADP 1,25 mM,  $MgCl_2$  1 mM,  $\alpha$  cetoglutarato sódico 5 mM, acetato amónico 50 mM, DPNH 0,1 mM y preparación enzimática. La reacción se sigue viendo la disminución en la absorción óptica a 340 nm, con un blanco sin acetato amónico.

Glutámico oxalacético transaminasa (E.C. 2.6.1.1).

a) en la dirección de formación de oxalacetato. Se utilizó un método acopiado a la malato deshidrogenasa semejante al descrito por Sizer y Jenkins (137). La mezcla de reacción en 1 ml contenía: imidazol HCl 50 mM, pH 7, KCl 0,1 M,  $MgCl_2$  5 mM, dilitioeritritol 1 mM, Tritón 0,1%, piridoxal fosfato 5 mM, aspartato sódico 10 mM,  $\alpha$  cetoglutarato sódico 5 mM, DPNH 0,1 mM, malato deshidrogenasa 1 unidad y preparación enzimática. La

reacción se seguía viendo el descenso en la absorción óptica a 340 nm restando los valores de un blanco en ausencia de aspartato.

b) en la dirección de formación de aspartato. Se utilizó un método semejante al descrito por Henson y Cleland (60). La mezcla de reacción consistía en 2 ml de tampón fosfato potásico 30 mM, pH 7, oxalacetato 0,1 mM, glutamato sódico 10 mM pH 7, y preparación enzimática. La reacción se siguió viendo el descenso de absorción a 257 nm en la escala ampliada del espectrofotómetro Cary 15 con un blanco en el que no se añadía glutamato. El retraso en la velocidad inicial (lag) mencionado por Henson y Cleland no fue muy marcado en nuestras condiciones, probablemente porque al utilizar preparaciones no purificadas existían en ellas suficiente oxalacetato ceto-enol tautomerasa (2) para acelerar la transformación entre la forma enólica, responsable de la absorción, y la cetónica, probable sustrato de la glutámico oxalacético transaminasa (60).

Isocitrato deshidrogenasa DPN dependiente (E.C. 1.1.1.41).

Se utilizó un método semejante al descrito por Plaut (107). La mezcla de reacción contenía en 1 ml: tampón imidazol HCl 50 mM, pH 7, isocitrato 1 mM, ADP 15 mM,  $MnCl_2$  2 mM, DPN 0,3 mM, Tritón 0,1% y preparación enzimática. La reacción se sigue viendo el aumento en la absorción óptica a 340 nm con un blanco en ausencia de isocitrato.

Isocitrato deshidrogenasa TPN dependiente (E.C.1.1.1.42).

Se utilizó un método modificado de Cleland y colab. (23). La mezcla de reacción estaba compuesta en 1 ml por: imidazol HCl 50 mM, pH 7, isocitrato 1 mM,  $MnCl_2$  2 mM, TPN 0,5 mM, Tritón 0,1% y preparación enzimática. La reacción se seguía como en el caso anterior.



Malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37). La reacción se seguía con un método de fundamento semejante al descrito por Ochoa (96).

a) en la dirección oxalacetato  $\longrightarrow$  malato. La mezcla de reacción estaba compuesta por: Imidazol HCl 50 mM, pH 7, KCl 0,1 M,  $MgCl_2$  5 mM, oxalacetato 0,5 mM, DPNH 0,1 mM y preparación enzimática. La reacción se seguía a 340 nm viendo la disminución en la absorción óptica con un blanco en ausencia de oxalacetato.

b) en la dirección malato  $\longrightarrow$  oxalacetato. La mezcla de reacción estaba compuesta en 1,5 ml por tampón fosfato 30 mM, pH 7, malato 5 mM, DPN (o acetil piridín DPN) 1 mM y preparación enzimática. La reacción se seguía viendo el aumento en la fluorescencia con un "fluorómetro" Beckman con un blanco sin malato.

Monoaminoxidasa (E.C. 1.4.3.4). Se empleó un método semejante al descrito por Tabor y colab. (148). La mezcla de reacción en 1 ml constaba de: tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7, benzilamina 3 mM y preparación enzimática. La reacción se seguía viendo el aumento en la absorción óptica a 250 nm con un blanco en ausencia de benzilamina.

Piruvato carboxilasa (E.C. 6.4.1.1). Se empleó un método semejante al descrito por Utter y Keech (160). La mezcla de reacción contenía en 0,5 ml: Tris HCl 100 mM, pH 7,  $MgCl_2$  5 mM, MgATP 3 mM,  $NaHCO_3$ - $^{14}C$  50 mM (1.500.000 dpm), piruvato sódico 20 mM, acetil-CoA 1 mM, glutamato sódico 15 mM, glutámico oxalacético transaminasa 1 unidad y preparación enzimática. La reacción se detiene con 50  $\mu$ l de HCl 5 N y después de

separar las proteínas precipitadas mediante centrifugación, la radioactividad ácido estable se mide en un contador de flujo de metano. Se lleva un blanco sin acetil-CoA.

Piruvato kinasa (E.C. 2.7.1.40). Se empleó un método semejante al descrito por Bücher y Pfeleiderer (19). La mezcla de reacción consistía en 1 ml de los siguientes reactivos: tampón imidazol HCl 50 mM, pH 7, KCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ADP 1 mM, fosfoenolpiruvato sódico 5 mM, DPNH 0,1 mM, lactato deshidrogenasa 0,5 unidades y preparación enzimática. La reacción se sigue a 340 nm viendo la disminución en la absorción óptica con blancos sin fosfoenolpiruvato o ADP.

Succínico citocromo c reductasa (E.C. 1.3.99.1). Se empleó un método semejante al descrito por Tisdale (156). La mezcla de ensayo contenía en 1 ml los siguientes reactivos: tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7, KCN 1 mM, EDTA 0,5 mM, citocromo c 0,1 mM, succinato 20 mM y preparación enzimática. La reacción se sigue a 550 nm viendo el aumento en la absorción óptica con un blanco sin succinato.

TPNH citocromo c reductasa (E.C. 1.6.2.3). Se empleó un método semejante al descrito por Sottocasa y colab. (142). La mezcla de reacción contenía en 1 ml los siguientes reactivos: tampón fosfato potásico 30 mM, pH 7, KCN 1 mM, EDTA 0,5 mM, TPNH 0,2 mM, citocromo c 0,1 mM y preparación enzimática. La reacción se sigue a 550 nm viendo el aumento en la absorción óptica con un blanco sin TPNH.

Uricasa (E.C. 1.7.3.3). Se utilizó un método semejante al descrito por De Duve y colab. (32). La mezcla de reacción

contenía en 1 ml: tampón fosfato potásico 30 mM, pH 7, urato sódico 0,1 mM y preparación enzimática. La reacción se sigue a 290 nm viendo el descenso en la absorción óptica, con un blanco sin urato.

=====

Todas las actividades enzimáticas se expresan en unidades internacionales, es decir,  $\mu$ moles de sustrato transformado por minuto.

Las proteínas se midieron por el método de Lowry y colab. (81a).

### III. RESULTADOS



### 1. Bases enzimáticas de las encrucljadas del oxalacetato y fosfoenolpiruvato

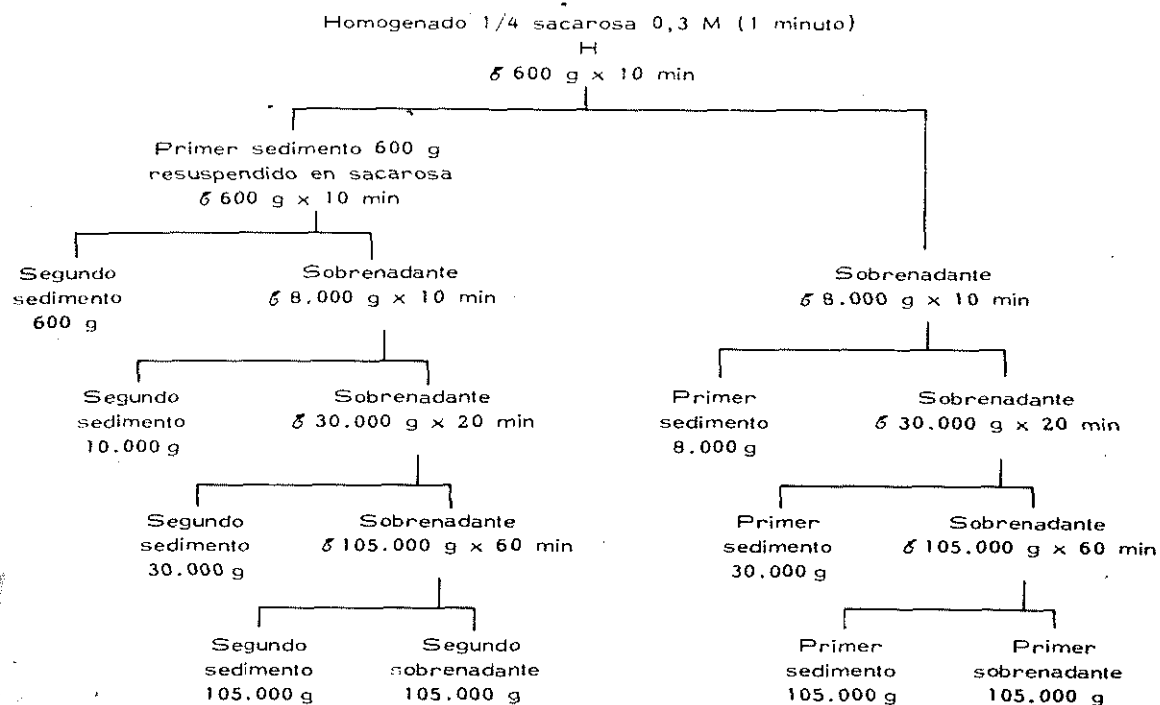
Como se indicó en la introducción, existían ciertas incertidumbres en la localización de los enzimas relacionados con las encrucljadas del oxalacetato. Por otra parte, como también se hizo notar, la aclaración de la compartimentación intracelular de los enzimas componentes de una vía metabólica junto con las relacionadas con ella es un primer paso necesario para poder aclarar los mecanismos fisiológicos que controlan su funcionamiento.

El principal problema estaba ligado a la localización de la piruvato carboxilasa, el primer enzima gluconeogénico. Los estudios iniciales de Utter (68) habían parecido indicar que este enzima se encontraba asociado a partículas y los estudios del grupo de Lardy (164) habían señalado la problemática que suponía la distinta localización de estos dos enzimas que habían de actuar en secuencia en gluconeogénesis: la piruvato carboxilasa particulada y la fosfoenolpiruvato carboxikinasa soluble. En los estudios iniciales de Utter aparecía asimismo una porción importante de piruvato carboxilasa asociada a la fracción nuclear sin que se aclarase el posible papel de esta parte del enzima. Posteriormente los estudios de Wagle (163) y muy especialmente del grupo de Seubert (59) parecían indicar que esta primera localización del enzima era fruto de un artefacto porque o bien la homogenización en caliente, o bien en presencia de un medio salino en lugar del habitual de sacarosa, hacían aparecer una cantidad considerable de piruvato carboxilasa soluble, suficiente al menos en términos

de velocidad medida en condiciones óptimas para hacer frente a las necesidades del flujo gluconeogénico.

Todo esto nos hizo examinar el problema de la distribución subcelular de los enzimas relacionados con las encrucijadas del oxalacetato.

Seubert en su estudio sobre la distribución subcelular de la piruvato carboxilasa había empleado un método simplificado de fraccionamiento subcelular y sus datos corresponden a una fracción particulada en la que existen núcleos, mitocondrias, microsomas y otros orgánulos celulares. Por otro lado la cantidad de piruvato carboxilasa encontrada en la fracción nuclear por Utter arrojaba algunas dudas sobre la naturaleza de las partículas con las que precipitaba la piruvato carboxilasa. Por todo ello se realizó inicialmente un estudio sobre el comportamiento de las diferentes fracciones que se pueden obtener por un método de fraccionamiento simple por centrifugación en un medio isotónico semejante a los desarrollados por la escuela de De Duve (31). Este estudio estaba principalmente dirigido a la elección de un método de fraccionamiento simplificado en el cual por un lado se aclarase la naturaleza de la partícula con la que sedimentaba la piruvato carboxilasa que aparecía en la fracción nuclear y por otro que descartase la posibilidad de una localización microsomal del enzima, ya que esto supondría de hecho una localización en el compartimiento citoplasmático. Para ello se efectuó el fraccionamiento cuyo esquema aparece en la Figura 3, en el que después de una primera homogenización durante 1 minuto en sacarosa 0,3 M se somete el homogenado a una primera centrifugación a 600 g durante 10 minutos y el sedimento se resuspende y rehomogeniza en el mismo medio y se vuelve a centrifugar a 600 g durante

Figura 3. Procedimiento de fraccionamiento de tejido

**Fig. 3. Procedimiento de fraccionamiento de tejido.  $\delta$  significa centrifugación a la aceleración y durante el tiempo indicados en la figura.**

10 minutos. A partir de este momento y en contraste con el procedimiento de De Duve (32) se llevan en paralelo ambos sobrenadantes. Primero se le somete a una centrifugación de 8000 g durante 10 minutos, cuyo sobrenadante se vuelve a centrifugar a 30.000 g x 20 minutos y finalmente el sobrenadante de la última centrifugación se vuelve a centrifugar a 105.000 g durante 40 minutos.

Los resultados de este fraccionamiento aparecen en la Tabla I A y B.

La razón de esta separación era tratar de identificar si era posible, la naturaleza de las partículas que aparecían en la fracción nuclear. Se estudiaron los siguientes enzimas: succínico citocromo c reductasa, marcador de mitocondrias (32); uricasa, marcador de peroxisomas (32); fosfatasa ácida, marcador de lisosomas (32); TPNH citocromo c reductasa, marcador de microsomas (105) y fosfoglucoasa isomerasa como enzima soluble. El principal componente de las fracciones obtenidas en la rehomogenización del primer precipitado a 600 g x 10 min. eran las mitocondrias seguidas por los lisosomas y peroxisomas, y en mucha menor proporción por los microsomas. Parece pues evidente que la cantidad de otras partículas atrapadas en la fracción nuclear y de restos celulares es función de su tamaño (123). Por otro lado, las fracciones provenientes de la segunda homogenización por efecto de ese segundo lavado poseían menor impurificación por sobrenadante. Como con la centrifugación a 8.000 g x 10 min. aunque precipitaban la mayoría de las mitocondrias quedaba una pequeña fracción que lo hacía a 30.000 g x 20 min., se eligió el siguiente procedimiento de fraccionamiento simplificado (Figura 4).

TABLA I A

Distribución de los marcadores enzimáticos de las distintas fracciones celulares en el procedimiento desarrollado de fraccionamiento.

	Succínico clt. c reductasa		Uricasa		Fosfatasa ácida				
	U/gr	mU/mg prot. %	U/gr	mU/mg prot. %	U/gr	mU/mg prot. %			
Homogenado	6,5	54	170	1,1	7	115	1,3	8	50
22 sedimento									
600 g x 10 min	1,5	31	30	0,25	5	25	0,45	9	14
1er. sedimento									
6.000 g x 10 min	2,2	103	43	0,29	14	13	0,50	24	16
22 sedimento									
8.000 g x 10 min	0,9	103	16	0,13	14	13	0,30	31	9
1er. sedimento									
30.000 g x 20 min	0,3	17	7	0,26	13	27	0,59	31	19
22 sedimento									
30.000 g x 20 min	0,03	11	1	0,02	7	2	0,23	80	7
1er. sedimento									
105.000 g x 1 h.	0,01	1	0,5	0,01	1	2	0,16	13	5
22 sedimento									
105.000 g x 1 h	0,01	0,5	0,1	0,01	1	0,1	0,20	73	6
1er. sobrenadante	0,01	0,1	0,1	0,01	0,1	0,1	0,32	8	11
22 sobrenadante	0,01	0,1	0,1	0,01	0,1	0,1	0,17	17	5

Para facilitar las comparaciones entre las diferentes fracciones, el tanto por ciento se calcula tomando como 100 la suma de las actividades encontradas en las diferentes fracciones. La recuperación en el fraccionamiento viene indicada por el tanto por ciento correspondiente al homogenado utilizando la misma base numérica para su cálculo.



TABLA IB

Distribución de los enzimas marcadores de las distintas fracciones celulares en el procedimiento desamplado de fraccionamiento.

	TPNH cl. c reductasa		Fosfoglucoasa isomerasa		Proteínas	
	U/gr	mU/mg prot. %	U/gr	mU/mg prot. %	mg/gr	%
Homogenado	3,50	22	117	48,4	300	95
2º precipitado 600 g x 10 min	0,87	18	29	5,8	12	11
1er. precipitado 8000 g x 10 min	0,54	26	18	3,9	19	7
2º precipitado 8000 g x 10 min	0,21	23	8	0,2	2	1
1er. precipitado 30.000 g x 20 min	0,65	38	24	3,2	18	1
2º precipitado 30.000 g x 20 min	0,11	38	4	0,1	2	1
1er. precipitado 105.000 g x 1 hr	0,43	36	15	1,1	19	4,5
2º precipitado 105.000 g x 1 hr	0,09	31	3	0,1	10	1
1er. sobrenadante	5	0,1	1	29,1	740	55
2º sobrenadante	5	0,6	1	6,8	660	13

(Ver el plé de la tabla IA).

Figura 4. Procedimiento simplificado de fraccionamiento de tejido

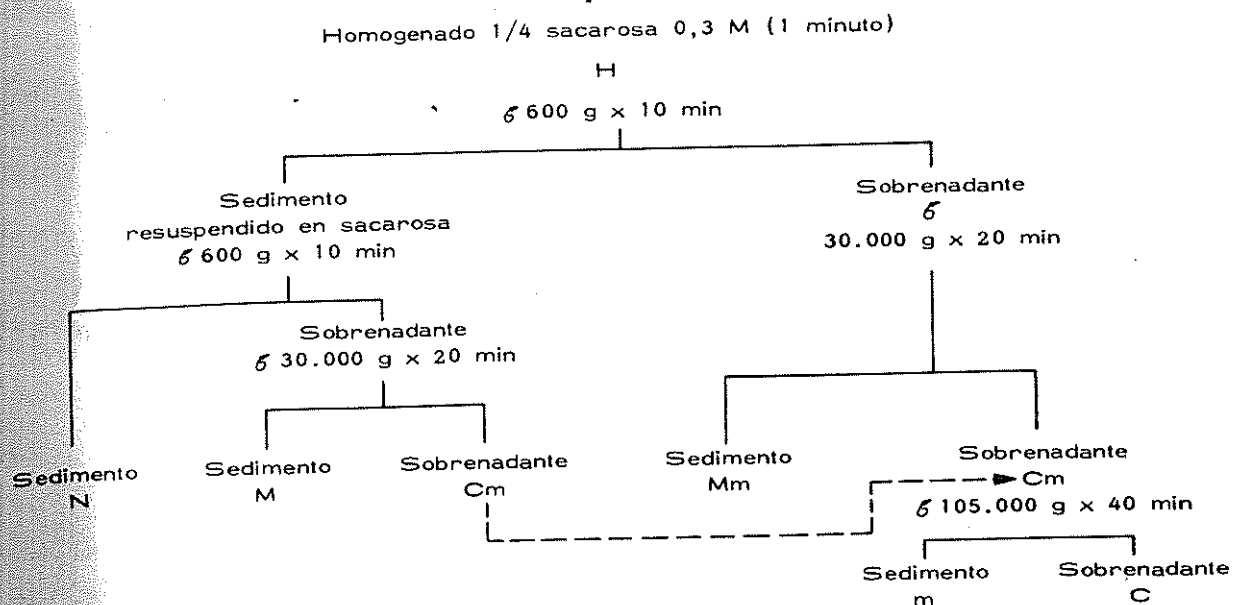
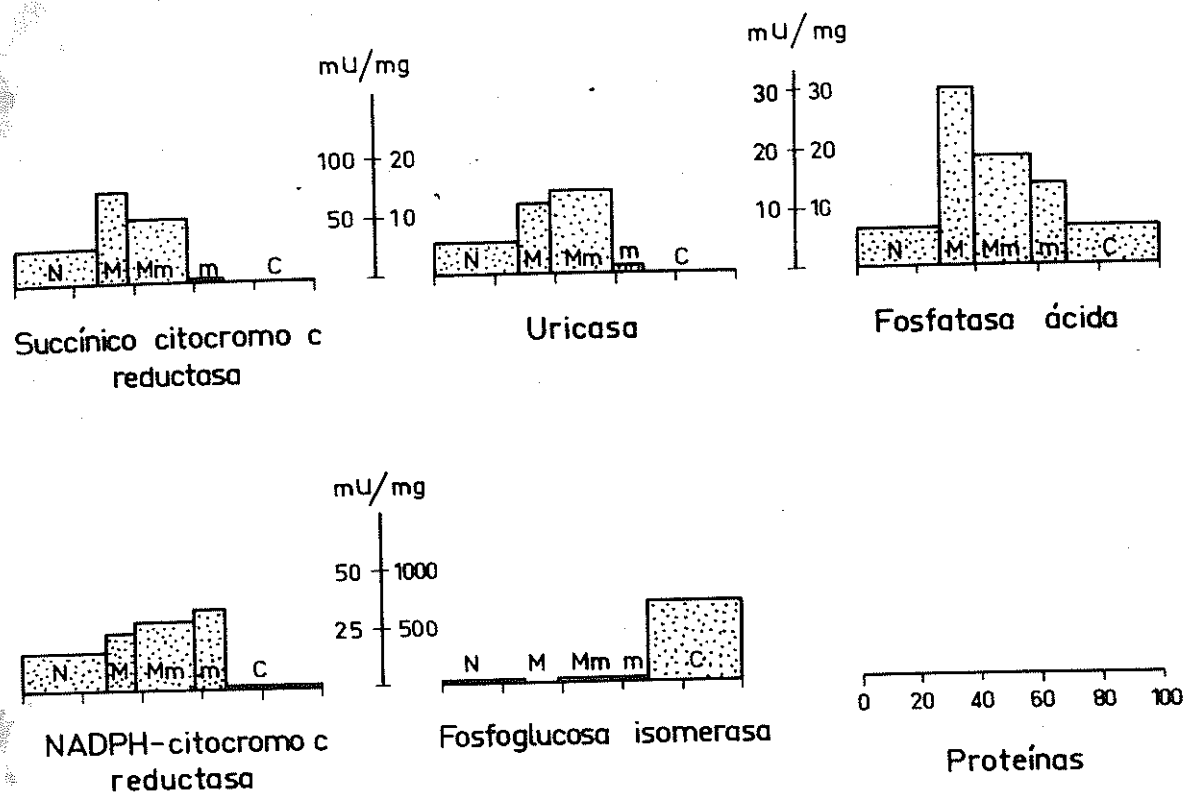


Fig. 4. Procedimiento simplificado de fraccionamiento de tejido.

Tras homogenización en sacarosa 0,3 M durante sólo 1 minuto se centrifugó a  $600\text{ g} \times 10\text{ min}$ . El sobrenadante se centrifugó a  $30.000\text{ g} \times 20\text{ min}$  y el sedimento formado principalmente por mitocondrias impurificadas por microsomas se designa con la letra Mm, el sobrenadante designado Cm está formado por el citosol (C) y la fracción microsomal (m), que eventualmente se separan tras centrifugación a  $105.000\text{ g} \times 60\text{ min}$ . El precipitado de la primera centrifugación se resuspende en el mismo medio de homogenización y se vuelve a centrifugar a  $600\text{ g} \times 10\text{ min}$ , el precipitado (N) contiene preferentemente núcleos, membranas y restos celulares. El sobrenadante se centrifuga a  $30.000\text{ g} \times 20\text{ min}$  obteniéndose un sedimento (M) formado preferentemente por mitocondrias. El sobrenadante (C'm) se unió al sobrenadante Cm anteriormente obtenido.

En la figura 5 se recoge el comportamiento de las diferentes fracciones. La succínico citocromo c reductasa marcador mitocondrial aparece exclusivamente localizada en las fracciones N, M y Mm, presentando una mayor actividad específica en la fracción M (esto se debe al mayor número relativo de otras partículas que precipitan entre  $7.000\text{ g} \times 10\text{ min}$  y  $30.000\text{ g} \times 20\text{ min}$ , ver tabla I A y B). Este comportamiento del marcador indica el gran número de mitocondrias que quedan atrapadas en los restos celulares de la fracción nuclear y que es extraordinariamente dependiente del tiempo y de la intensidad de la homogenización. En este caso se han empleado además homogenizaciones especialmente suaves (1 minuto) para minimizar el posible daño mitocondrial. Tanto la fracción peroxisomal como la lisosomal difieren en su distribución del comportamiento de la succínico citocromo c, especialmente en la menor cantidad relativa atrapada en la fracción

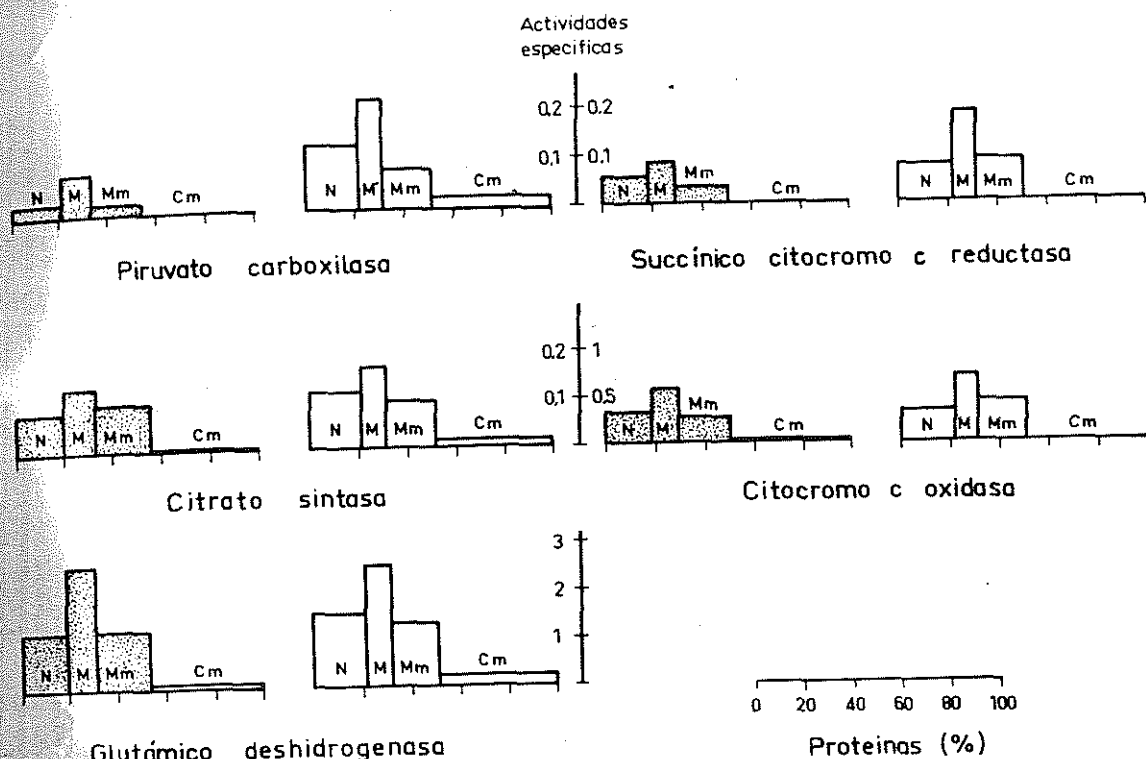


**Fig. 5. Distribución de los enzimas marcadores de las diferentes fracciones celulares en el fraccionamiento simplificado.** Para el significado de las abreviaturas ver la figura 4.

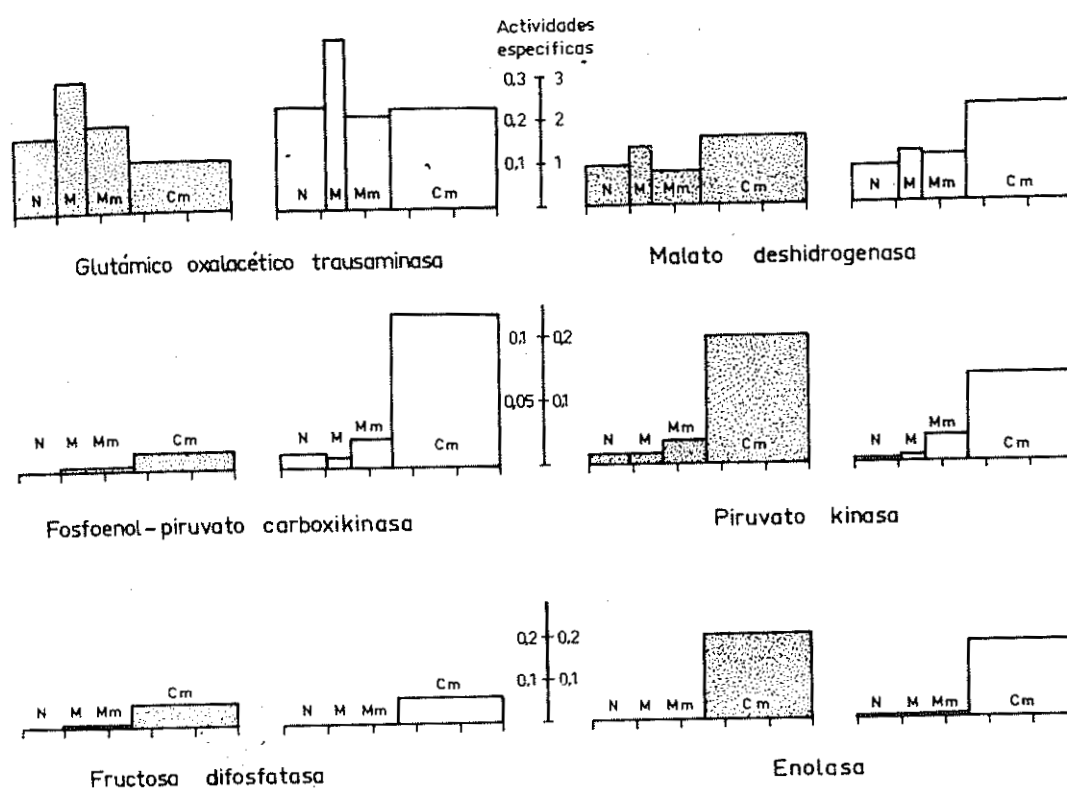
nuclear. La TPNH citocromo c reductasa, enzima fundamentalmente localizado en los microsomas, aparece con máxima actividad específica en la fracción m. La parte del enzima que aparece en las fracciones M y Mm proviene en parte de los microsomas precipitados particularmente en la centrifugación entre 7.000 g x 10 min y 30.000 g x 20 min (ver tabla I A y B) pero también de la membrana externa de las mitocondrias que según los estudios de Brunner y Bygrave (17) también forma parte de esta estructura mitocondrial tan emparentada con los microsomas.

En la figura 6a y 6b se exponen nuestros resultados en lo que respecta a la localización de los enzimas de las encrucijadas metabólicas del oxalacetato y del fosfoenolpiruvato. En ellas se estudian los siguientes enzimas: piruvato carboxilasa, citrato sintasa, málico deshidrogenasa, glutámico oxalacético transaminasa y fosfoenolpiruvato carboxilkinasa como enzimas relacionados con las encrucijadas del oxalacetato. La piruvato kinasa, enolasa y fructosa difosfatasa como enzimas de la encrucijada del fosfoenolpiruvato y glutámico deshidrogenasa, citocromo oxidasa y succínico citocromo c oxidasa como marcadores mitocondriales. Para excluir la posibilidad de que hubiese diferencias según el animal se encontrase en condiciones gluconeogénicas o no gluconeogénicas se llevó en paralelo este fraccionamiento con hígados de ratas normalmente alimentadas y ayunadas 48 horas. Como puede verse en la figura 6a y 6b el tratamiento dietario si bien cambia las actividades relativas de algunos de estos enzimas no produce ningún cambio en la distribución subcelular de ninguno de los enzimas estudiados. La piruvato carboxilasa y la citrato sintasa siguen exactamente la distribución de los tres enzimas marcadores mitocondriales





**Fig. 6a. Distribución en las diferentes fracciones celulares de la piruvato carboxilasa, citrato sintasa y los tres marcadores mitocondriales: succínico citocromo c reductasa, citocromo oxidasa y glutámico deshidrogenasa. Las barras punteadas corresponden a animales normalmente alimentados y las blancas a animales ayunados 48 horas. N, fracción nuclear; M, fracción mitocondrial impurificada con microsomas y Cm, citosol con microsomas.**



**Fig. 6b. Distribución de los otros enzimas de las encrujadas metabólicas del oxalacetato y fosfoenolpiruvato. Los signos tienen el mismo significado que en la figura 6a.**

glutámico deshidrogenasa, citocromo oxidasa y succínico citocromo c reductasa que a su vez son también absolutamente coincidentes entre sí. De estos resultados se puede deducir la prácticamente exclusiva localización mitocondrial de estos dos enzimas. La pequeña porción de estos enzimas que aparece en la fracción Cm es prácticamente en su totalidad soluble, como hemos comprobado separando el citosol de los microsomas por una centrifugación adicional (105.000 g x 60 min). La mayor recuperación de enzima en la fracción soluble de los hígados provenientes de ratas ayunadas en el caso de la piruvato carboxilasa, citrato sintasa y glutámico deshidrogenasa apunta hacia una mayor alteración a lo largo del procedimiento de extracción de las mitocondrias provenientes del animal ayunado (126). La parte de piruvato carboxilasa y citrato sintasa que aparecen en la fracción N pertenecen a mitocondrias retenidas en los restos celulares como puede deducirse por el comportamiento completamente similar de los enzimas marcadores mitocondriales glutámico deshidrogenasa, succínico citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa. Esto además se confirma cuando se somete esa fracción a un nuevo subfraccionamiento como el que puede verse en la Tabla 2, en donde se puede comprobar que la fracción correspondiente a los núcleos más purificados (Np) prácticamente carece de piruvato carboxilasa, y glutámico deshidrogenasa y su actividad específica disminuye con respecto a la fracción membranosa. La glucosa 6 fosfatasa presenta un comportamiento similar.

La glutámico oxalacético transaminasa y la málico deshidrogenasa presentan en el fraccionamiento simplificado (figura 6b) una distribución idéntica típica de enzimas con una localización doble, mitocondrial y citoplasmática.

TABLA 2

Subfraccionamiento de la fracción nuclear N

	Piruvato carboxilasa		Glutámico deshidrogenasa		Glucosa 6-fosfatasa	
	U/gr	U/mg	U/gr	U/mg	U/gr	U/mg
Fracción N	5,4	0,09	85	1,5	7	0,11
Fracción Np	0,38	0,06	6	0,9	0,1	0,01
Fracción Me	3,2	0,1	45	1,4	3	0,07

La fracción N proveniente de un fraccionamiento simplificado de una rata normalmente alimentada se resuspendió en sacarosa 2,2 M y se centrifugó a 105.000 g x 60 min, según el procedimiento de Fandé y Mead (98) obteniéndose un pellet homogéneo formado por núcleos purificados (Np) y una capa membranosa en la superficie (Me).

La fosfoenolpiruvato carboxikinasa, fructosa difosfatasa, piruvato kinasa y enolasa presentan igualmente la misma localización citoplasmática, lo que plantea en toda su agudeza el problema de la regulación de la encrucijada del fosfoenolpiruvato que será discutido más adelante.

El estudio presentado hasta aquí ha sido realizado en condiciones de homogenización semejantes a las utilizadas por De Duve y colab. (32): sacarosa 0,3 M a 4° C. Sin embargo Wagle (163) había indicado que la homogenización a temperatura ambiente elevaba la cantidad de piruvato carboxilasa solubilizada. Los resultados presentados en la tabla 3 no apoyan su pretensión. La homogenización y centrifugación realizadas a 25° no cambian marcadamente la cantidad de piruvato carboxilasa obtenida en el sobrenadante. Por otro lado, Seubert (59) pretendía que la diferencia de sus resultados con respecto a los anteriores de Utter (68) dependía de la utilización en su medio de homogenización de trietanolamina 0,1 M. Los resultados de la tabla 4 presentan los valores de la piruvato carboxilasa particulada y soluble homogenizada en un medio salino, en un medio con sacarosa y en el medio de Seubert. No existen diferencias importantes fisiológicamente en la localización de la piruvato carboxilasa según el medio utilizado.

Después de los estudios presentados aquí parecía zanjado el problema de la localización de la piruvato carboxilasa, quedando claro que este enzima precipitaba casi exclusivamente con las mitocondrias. Nuestros resultados no apoyaban la hipótesis de Seubert y Wagle de un enzima fácilmente adsorbible al material particulado celular en determinadas condiciones pero tampoco lo excluían definitivamente. Por otra parte, se sabe que la



TABLA 3

Efecto de la temperatura de homogenización sobre la relación piruvato carbo-  
hidrato soluble y particulada de hígado de rata

Temperatura de homogenización y centrifugación	0° - 4° C	25° C
Fracción particulada P (U/gr de tejido)	7	7
Fracción soluble (U/gr de tejido)	1	2
Relación S/P	0.2	0.3

La fracción particulada es el sedimento obtenido después de centrifugar el homogenizado a 30.000 g x 20 min y corresponde a la suma de las fracciones N + M + Min del fraccionamiento simplificado.

TABLA 4

Efecto del medio de homogenización sobre la relación piruvato carboxilasa soluble y particulada de hígado de rata

Medio	Salino	Sacarosa	Trietanolamina %
Fracción particulada P (U/gr)	11	11	5
Fracción soluble S (U/gr)	2	2	1
Relación S/P	0,2	0,2	0,2

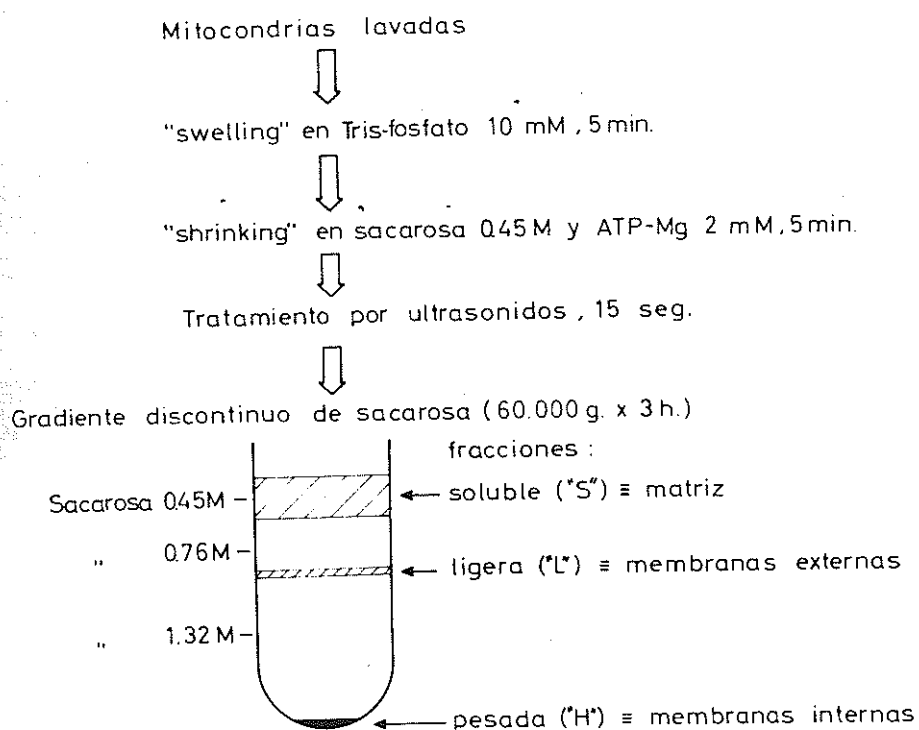
Para la composición de las fracciones ver la tabla 3 y para los medios de homogenización ver materiales y métodos (II.3)

\* El experimento del que se han tomado los datos de la trietanolamina corresponde al presentado en la tabla anterior 3, lo que explica la discrepancia en los valores absolutos.

mitocondria es una estructura compleja compuesta de varias membranas, una externa, otra interna y de un espacio interno relleno de una matriz proteica. Estudios de Klingenberg (104) han puesto en claro que la membrana externa es permeable a compuestos químicos y macromoléculas de un peso molecular de hasta 5.000, mientras que la membrana interna constituye la verdadera barrera que separa el compartimiento mitocondrial del citoplasmático. Por tanto si el enzima piruvato carboxilasa fuese parte de la membrana externa, de la parte externa de la membrana interna o del espacio intermembranoso, precipitaría con la mitocondria, pero sería totalmente activo sobre los sustratos citoplasmáticos. A fin de confirmar o descartar esta posibilidad se realizó un estudio de la distribución submitocondrial de la piruvato carboxilasa y los demás enzimas relacionados con la encrucijada del oxalacetato que precipitan con las mitocondrias con los resultados que se exponen a continuación.

Se utilizó para este fraccionamiento submitocondrial el método desarrollado por el grupo de Ernster (141) cuyo esquema puede verse en la figura 7. Las mitocondrias lavadas se obtienen con una centrifugación a 8.000 g x 10 min de un homogenado al 1/10 de hígado de rata en sacarosa 0,25 M (después de una primera centrifugación a 600 g x 10 min). Se vuelven a lavar 3 veces en sacarosa 0,25 M según el método descrito por Sottocasa et al. (141). Después se someten a un "swelling" en Tris-fosfato 10 mM, pH 7,5, durante cinco minutos, a un "shrinking" en sacarosa 0,45 M con MgATP 2 mM durante otros cinco minutos y se someten a acción de los ultrasonidos a 3 amperios de intensidad durante 15 segundos. Las mitocondrias así tratadas se someten

Obtención de las distintas fracciones submitocondriales

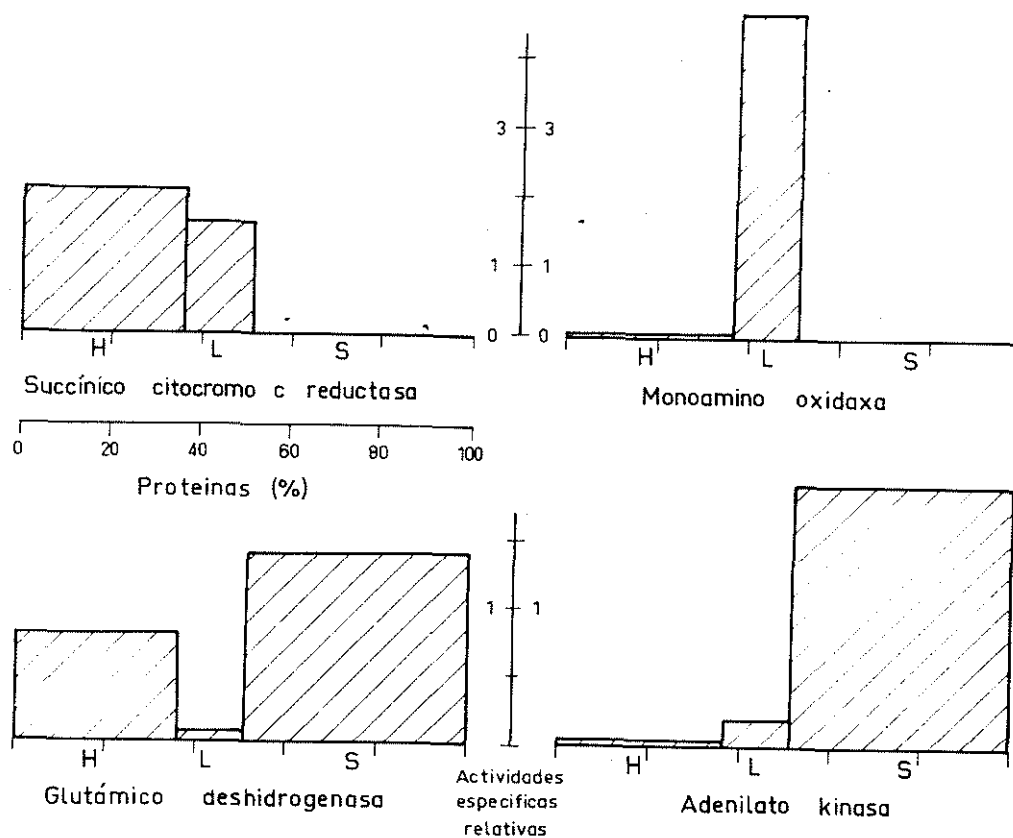


**Fig. 7. Esquema del procedimiento de fraccionamiento submitocondrial según Sottocasa y colsb. (141).**

a un gradiente discontinuo de sacarosa como aparece en la figura 7 durante 3 horas a 60.000 g. De esta forma se obtienen tres fracciones: una pesada ("H") que aparece en el fondo del tubo de centrífuga formada principalmente por membranas internas, una fracción ligera ("L") que aparece en la interfase entre la sacarosa 1,32 M y 0,76 M enriquecida en membranas externas y una fracción soluble "S".

Con el uso de este procedimiento de fraccionamiento aparecen cuatro clases de distribución diferente como puede verse en la figura 8 y en la tabla 5. Estas cuatro clases de distribución corresponden a las siguientes localizaciones mitocondriales. Los enzimas asociados a la membrana interna como es la succínico citocromo c reductasa y la DPNH citocromo c reductasa rotenona sensible aparecen asociados fundamentalmente a la fracción pesada H aunque también aparecen, bien que con menor actividad específica, en la ligera L. Los enzimas asociados con la membrana externa como la monoaminooxidasa y la DPNH citocromo c reductasa rotenona insensible aparecen prácticamente de forma exclusiva asociados a la fracción L y con un gran aumento de 5 - 6 veces en la actividad específica. Los enzimas procedentes de la matriz mitocondrial como son la glutámico deshidrogenasa y la málico deshidrogenasa aparecen asociados con la fracción soluble S y en menor proporción con la pesada H. Una cuarta clase de distribución es la de la adenilato kinasa que según Sottocasa *et al.* (141) puede interpretarse como la de un enzima procedente del espacio intermembranoso asociado a la membrana externa pero de forma muy lábil. Esta opinión se refuerza con los resultados obtenidos con otro método, el de la digitonina, que rompe específicamente la membrana externa y libera también prácticamente la





**Fig. 8. Comportamiento de los marcadores de las diferentes fracciones submitocondriales obtenidas con el método de Sotocasa y colab. (141). El significado de las letras se explica en la figura anterior. La actividad específica relativa se calcula dividiendo la actividad específica de cada fracción por la de las mitocondrias intactas.**

TABLA 5

Actividades enzimáticas en las fracciones submitocondriales de hígado de rata

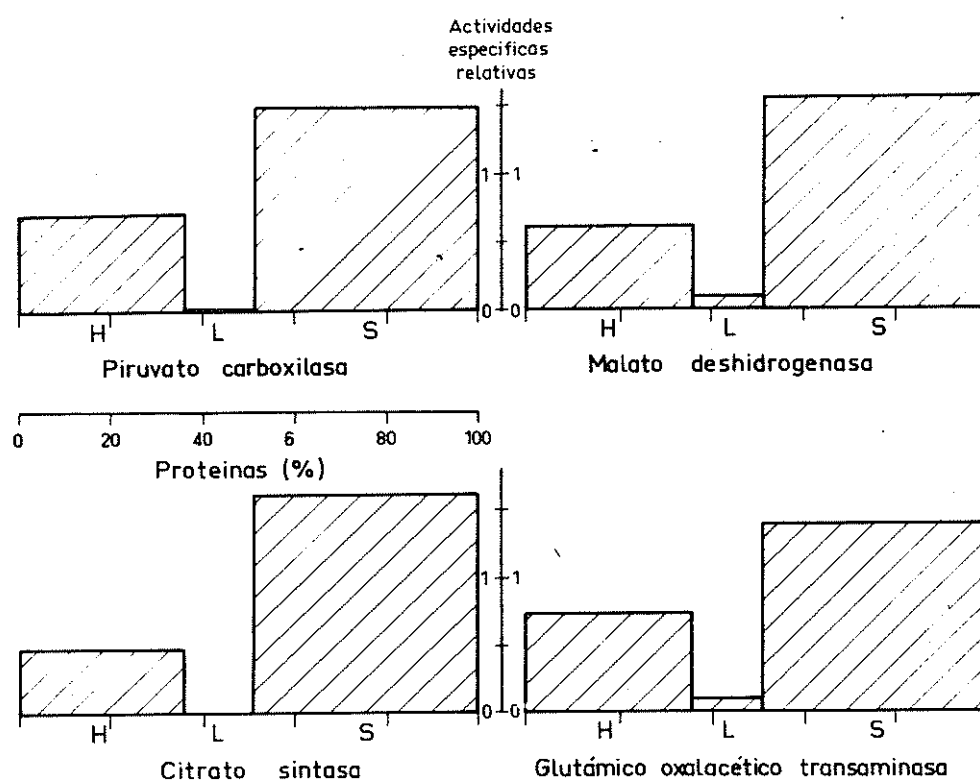
	Nº de animales	Fracciones					
		Ligera (L) (membrana externa)		Pesada (H) (membr. interna)		Soluble (S) (matriz*)	
		act. esp. %	%	act. esp. %	%	act. esp. %	%
DPNH-cit.c reductasa (rotenona ins.)	(4)	0,80 ± 0,40	74	0,09 ± 0,02	19	0,023 ± 0,001	7
Monoaminoxidasa	(5)	0,026 ± 0,003	67	0,005 ± 0,001	33	0,001	1
Adenilato kinasa	(5)	0,04 ± 0,01	3	0,010 ± 0,002	2	0,43 ± 0,08	95
Succínico cit.c reductasa	(5)	0,17 ± 0,02	23	0,23 ± 0,05	75	0,003 ± 0,002	2
DPNH-cit.c reductasa (rotenona sens.)	(4)	0,09 ± 0,02	21	0,12 ± 0,02	71	0,008 ± 0,005	8
Glutámico deshidrogenasa	(3)	0,15 ± 0,04	1	2,1 ± 0,2	30	3,5 ± 0,8	69
Piruvato carboxilasa	(5)	<0,005	<1	0,069 ± 0,008	26	0,135 ± 0,010	74
Malato deshidrogenasa	(5)	0,19 ± 0,05	2	0,73 ± 0,19	24	1,66 ± 0,41	74
Glutámico oxalacético transaminasa	(3)	0,26 ± 0,09	2	1,10 ± 0,14	27	2,06 ± 0,36	71
Citrato sintasa	(4)	0,006 ± 0,001	1	0,037 ± 0,005	20	0,106 ± 0,029	79
Isocitrato deshidrogenasa-TPN	(4)	0,008 ± 0,003	1	0,10 ± 0,01	25	0,21 ± 0,01	74
Isocitrato deshidrogenasa-DPN	(4)	0,002 ± 0,001	3	0,009 ± 0,002	34	0,012 ± 0,002	63

\* En el caso de la adenilato kinasa corresponde al espacio intermembranos.  
act. unidades/mg proteína ± error standard de la media

totalidad de la adenilato kinasa (16). En la tabla 5 se pueden ver los valores absolutos de las actividades de estas enzimas en las distintas fracciones.

En esa tabla y en la figura 9 aparecen los resultados de la distribución de los enzimas de la encrucijada mitocondrial del oxalacetato. Como puede verse en ellas tanto la piruvato carboxilasa, como la citrato sintasa como la glutámico oxalacético transaminasa presentan una distribución correspondiente a la de los enzimas de matriz mitocondrial. Esta localización pues excluye completamente la posible acción de estos enzimas sobre sustratos extramitocondriales.

Los estudios de Kornberg y Pricer (71) llevaron en 1951 a la identificación de dos isocitrato deshidrogenasas; la una utilizaba TPN como cosustrato y la otra DPN. Otra diferencia importante estriba en que la isocitrato deshidrogenasa DPN dependiente es un enzima alostérico, activado por AMP en levadura (71) y por ADP en tejidos de organismos superiores (27, 46, 145), lo que ha hecho postular su importancia en el control del ciclo de Krebs (4, 49). Los estudios de Goebell y Pette (47) localizaron precisamente a la isocitrato deshidrogenasa DPN dependiente en la mitocondria lo que estaba de acuerdo con el aserto anterior. Por otro lado la isocitrato deshidrogenasa TPN dependiente tiene dos localizaciones, una citoplasmática y otra mitocondrial. Como este enzima no está regulado y su actividad en las mitocondrias de ciertos tejidos de rata como el hígado es bastante superior incluso a la DPN dependiente (47 y 145), Stein y colab. (145) plantean cómo esa regulación (la de la DPN dependiente) puede ser importante en esas condiciones. Una suposición era que ambas isocitrato deshidrogenasas estuviesen localizadas en distintos

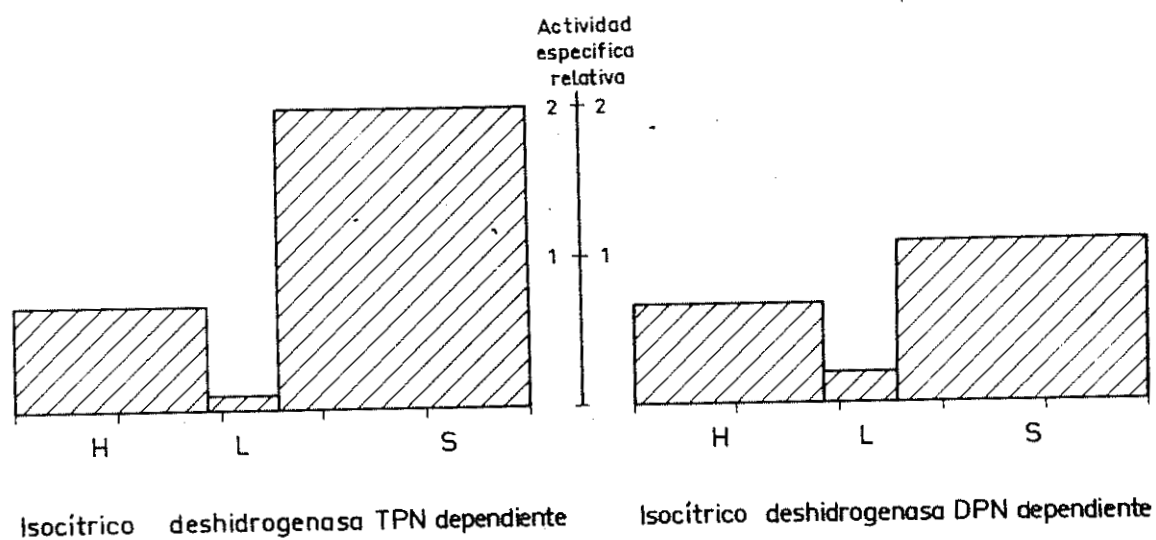


**Fig. 9. Distribución de los enzimas de la encrucijada mitocondrial del oxalacetato en las distintas fracciones submitocondriales.**

compartimientos mitocondriales (145). Para probar esta posibilidad se incluyeron ambas enzimas en los análisis de las distintas fracciones submitocondriales. Los resultados aparecen en la figura 10 y tabla 5. La isocitrato deshidrogenasa TPN dependiente mitocondrial se sabía que era un enzima de la matriz (16, 141) y como puede verse en la figura 10, la DPN dependiente también es un enzima de la matriz. Este resultado plantea claramente el problema de la regulación de ese paso del ciclo de Krebs.

Los resultados presentados hasta este momento corresponden todos ellos a hígado de rata. Sin embargo desde los estudios de Nordlie y Lardy (94) se sabe que la distribución exclusivamente citoplasmática de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa no es un hecho general sino que hay otros mamíferos como es el conejo en el que aparece en su mayor parte como particulada, mientras que en otros como son el cobaya y el propio hombre (132) aparece con una doble localización, por un lado citoplasmática y por otro mitocondrial. Se planteaba pues si en estos animales que tenían la mayoría o parte de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa mitocondrial la situación de estas enzimas sería o no diferente a la rata, es decir, si el enzima que se sabía precipitaba con las mitocondrias era o no activo sobre sustratos extramitocondriales. En un primer momento se abordó el examen de distintas actividades enzimáticas relacionadas con la encrucijada del oxalacetato para verificar si el único enzima con comportamiento radicalmente diferente era la fosfoenolpiruvato carboxikinasa con los resultados de la tabla 6. Tanto la piruvato carboxilasa como la citrato sintasa se comportan igual, siendo particuladas, la piruvato kinasa, enolasa y fructosadifosfatasa son solubles y la glutámico oxalacético transaminasa y la málico deshidrogenasa tienen una localización doble.





**Fig. 10. Distribución de las dos isocitric deshidrogenasas DPN y TPN dependientes en las distintas fracciones submitocondriales.**

TABLA 6

Proporción de las actividades solubles respecto de las particuladas de los  
enzimas relacionados con las encrujiladas del oxalacetato y isoenolpiruvato  
en hígado de rata y de conejo

Soluble/particulada	
Conejo	Rata
Citrato sintasa	0,1
Piruvato carboxilasa	0,09
Fosfoenolpiruvato carboxilasa	7
Glutámico oxalacético transaminasa	0,4
Malato deshidrogenasa	1,7
Piruvato kinasa	11
Enolasa	7
Fructosa difosfatasa	11

La fracción soluble es el sobrenadante de aplicar al homogenado una centrifugación de 30.000 g x 20 min y la particulada (formada por núcleos, restos celulares, mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y parte de microsomas) es el precipitado obtenido en dicha centrifugación.

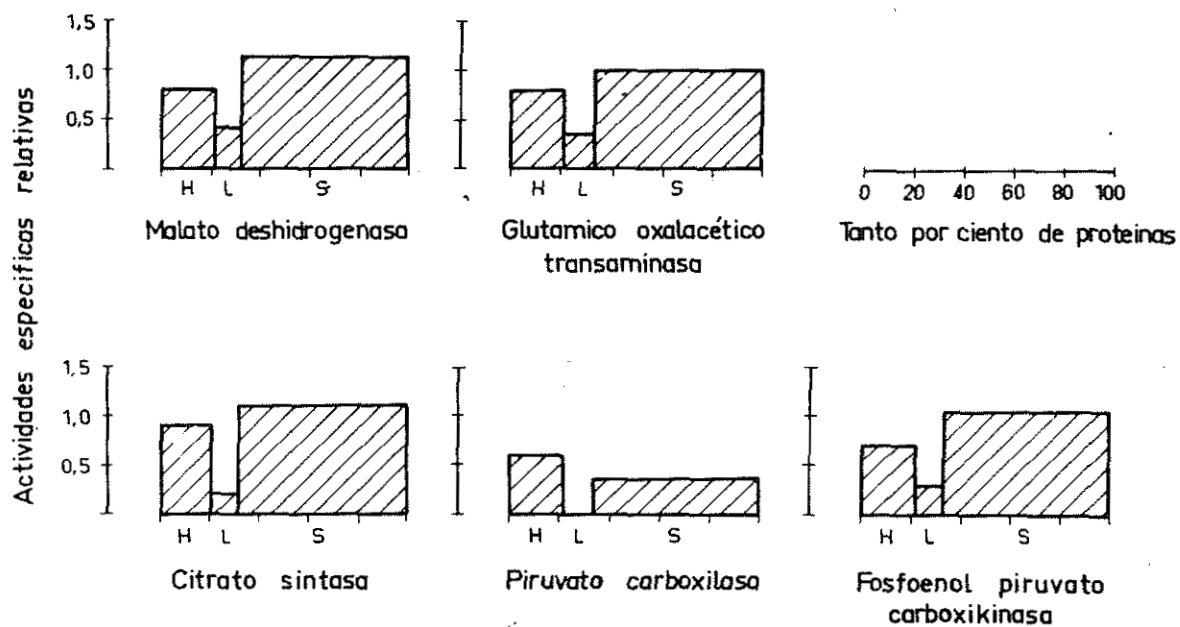
Es por tanto sólo el caso de la fosfoenolpiruvato carboxikínasa la que presenta una gran variación de un animal al otro. Mientras que en la rata es casi totalmente soluble, en el conejo es preferentemente mitocondrial aunque también parece existir en la fracción soluble un enzima citoplasmático (distinto o no del mitocondrial) capaz de responder adaptivamente a la dieta (66).

Por tanto se estudió la localización submitocondrial de los enzimas de la encrucijada metabólica del oxalacetato y como puede verse en la figura 11, todos los enzimas: fosfoenolpiruvato carboxikínasa, citrato sintasa, piruvato carboxilasa, málico deshidrogenasa y glutámico oxalacético transaminasa aparecen como enzimas de la matriz mitocondrial.

## 2. Enzimas de la encrucijada mitocondrial del oxalacetato

### A. Variación en la actividad de los enzimas.

Como se indicó en la Introducción, la regulación de una vía metabólica puede ejercerse por variación en la actividad de uno (el primero irreversible) o varios de los enzimas que la componen o por cambio en la actividad de aquel enzima clave, cambio en la actividad mediado por un efecto alostérico o por un cambio de forma. Aunque en los organismos superiores los modelos actuales de la regulación de la expresión génica tal como se ha venido exponiendo para las células bacterianas (35, 64) no parece que en general sean operativos ya que junto a otras propiedades inherentes a aquel modelo concreto, las siguientes características de los organismos superiores tienden a amortiguar



**Fig. 11. Distribución entre las distintas fracciones submitocondriales de hígado de conejo de los enzimas de la encrucijada metabólica del oxalacetato.** Los significados de las abreviaturas se explican en los pies de las figuras 7 y 8. Las fracciones se obtuvieron por el método de Sottocasa y colab. (141).

su posible transcendencia: a) la vida media de los mensajeros (29) es más bien alta, b) el papel importantísimo jugado por la velocidad de degradación de las proteínas en la conservación de los niveles de las mismas (124, 125), c) la mayor constancia en el medio interno en relación con las posibles variaciones del medio externo en los microorganismos, d) la mayor complejidad de la célula eucariótica y nuestro mayor desconocimiento sobre todos los posibles mecanismos de la expresión genética en estos sistemas (43, 58), sigue siendo interesante el examen de las posibles variaciones de nivel de los enzimas de una encrucijada.

En la tabla 7 pueden verse efectivamente los cambios en las actividades óptimas encontrados en los enzimas de la encrucijada mitocondrial del oxalacetato. Los niveles de todos los enzimas examinados expresados por gramo de tejido aumentan, pero la mayor parte: citrato sintasa, glutámico oxalacético transaminasa, malato deshidrogenasa y glutámico deshidrogenasa lo hacen sólo en la misma proporción aproximadamente que lo hacen las proteínas, por lo que probablemente no corresponden a un aumento real de actividad sino que son una consecuencia de la concentración experimentada por el hígado ya que éste sufre en los primeros días de ayuno una caída en la cantidad de agua junto con otros componentes citoplasmáticos. Por otro lado tanto la piruvato carboxilasa como la succínico citocromo c reductasa aumentan más claramente. Las condiciones empleadas no son capaces de excluir si este aumento está producido por un real aumento en la concentración o en los niveles de estos enzimas o un cambio de forma con la consiguiente variación en los valores de los mismos.



TABLA 7

Efecto del ayuno de 48 horas sobre los niveles (actividades medidas en condiciones saturantes) de los enzimas de la encefalopatía mitocondrial del oxalacetato

	Normal	Ayuno de 48 horas	+ %
	U/gr $\pm$ e.s.m.	U/gr $\pm$ e.s.m.	
Piruvato carboxilasa	3,5 $\pm$ 0,3 (4)	14,4 $\pm$ 2,5 (5)	300
Citrato sintasa	10,5 $\pm$ 3,5 (4)	15,5 $\pm$ 3 (3)	50
Malato deshidrogenasa	96 $\pm$ 2 (3)	159 $\pm$ 13 (3)	65
Glutámico oxalacético transaminasa	20 $\pm$ 14 (3)	42 $\pm$ 13 (5)	100
Glutámico deshidrogenasa	200 $\pm$ 15 (4)	270 $\pm$ 25 (5)	35
Succínico citocromo c reductasa	4,6 $\pm$ 1,2 (3)	17 $\pm$ 1,1 (3)	250
Proteínas% de la fracción particulada	86 $\pm$ 12 (6)	142 $\pm$ 10 (8)	65
Hígado%*	5,3 $\pm$ 0,2 (3)	3,0 $\pm$ 0,2 (3)	

\* mg/gr      %\* gramos de tejido

Estos valores corresponden a la totalidad de la actividad enzimática medida en condiciones saturantes de los enzimas exclusivamente mitocondriales y a la actividad que precipita con las fracciones particuladas en el caso de los enzimas de doble localización. La fracción particulada en este caso es la que sedimenta al aplicar una fuerza centrífuga de 30.000 g x 20 min. Los hígados provienen de ratas hembras de unos 100 gr. de peso.

De cualquier forma, los valores medidos de estas enzimas, lo están en condiciones óptimas y en el caso de la piruvato carboxilasa en presencia de una concentración prácticamente saturante de su activador alostérico acetil CoA. Muy probablemente sean los cambios en la concentración de este metabolito, totalmente necesario para que la piruvato carboxilasa sea activa, el mecanismo primario de regulación de este enzima y sólo de una manera secundaria influyan esas variaciones en la actividad, dependiendo en buena parte de su rapidez.

### B. La piruvato carboxilasa como enzima anaplerótica.

La utilización de un tratamiento dietario tal como el presentado en la tabla 8 permitió encontrar nuevos argumentos a favor del papel anaplerótico (72) de la piruvato carboxilasa, es decir, a favor de su papel en el aporte de intermediarios que mantengan el nivel de funcionamiento del ciclo de Krebs más que en un papel exclusivamente gluconeogénico. La administración de una dieta glucosa (90%) durante cinco días hace supérflua cualquier gluconeogénesis, como puede comprobarse por la fuerte represión de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa. Sin embargo, durante el tratamiento con glucosa la lipogénesis estará exaltada lo que junto a otros posibles procesos que drenan de intermediarios al ciclo de Krebs exige que se mantenga la acción anaplerótica de la piruvato carboxilasa. En este caso y en contraste con la fosfoenolpiruvato carboxikinasa este enzima no sólo no disminuye sino que incluso aumenta. Por el contrario con una dieta fuertemente gluconeogénica como es la dieta hiperproteica, pero que debe dar abundantes intermediarios del ciclo de Krebs por desaminación de los aminoácidos componentes de las proteínas

TABLA 8

Disociación en los niveles de la piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa de hígado de rata en función del tratamiento dietario

	Piruvato carboxilasa	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa
	U/gr $\pm$ e.s.m.	U/gr $\pm$ e.s.m.
Dieta normal	5,1 $\pm$ 0,3 (3)	1,4 $\pm$ 0,3 (3)
Dieta hiperproteica (5 días)	2,6 $\pm$ 0,2 (3)	16 $\pm$ 4 (3)
Dieta glucosa 90% (5 días)	6,6 $\pm$ 0,5 (4)	0,2 $\pm$ 0,2 (3)

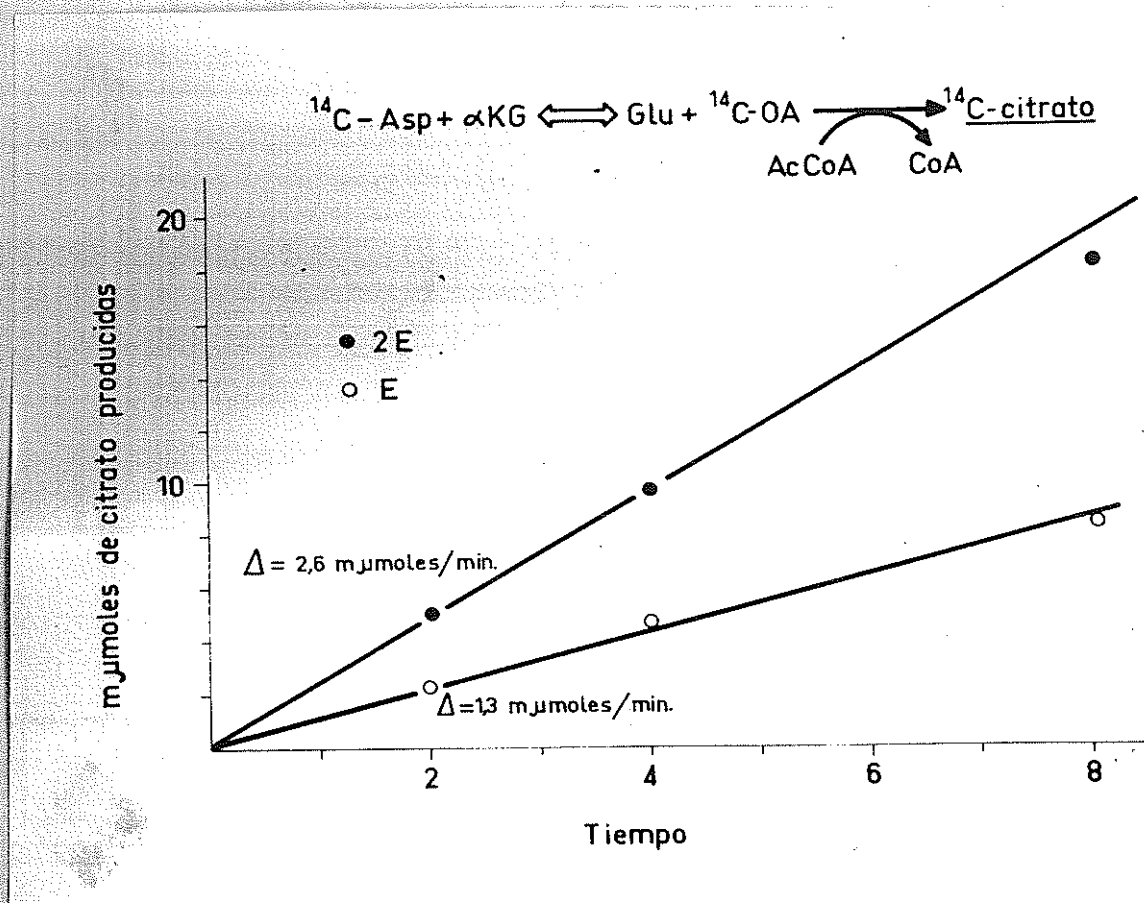
Los hígados provienen de ratas macho de unos 100 gr. de peso.

de la dieta, la piruvato carboxilasa desciende a la mitad, mientras que en contraste la fosfoenolpiruvato carboxikinasa aumenta unas 10 veces.

Este experimento además demuestra una disociación en el comportamiento de estas dos enzimas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa, lo que no apoya por tanto la hipótesis de una unidad funcional génica para los enzimas gluconeogénicos, extendiendo los trabajos realizados en este sentido en nuestro laboratorio por Sillero y colaboradores (135) con resultados semejantes a otros niveles.

#### C. Propiedades cinéticas de la citrato sintasa en relación con la encruclizada del oxalacetato.

A fin de poder trabajar a concentraciones de oxalacetato cercanas a las fisiológicas se puso en marcha un método específico de ensayo de la citrato sintasa que por otro lado fuera apto para ser empleado en extractos crudos y preparaciones poco purificadas del enzima. El fundamento del método puede verse en la figura 12. Se forma oxalacetato radioactivo en el propio tubo de ensayo a partir de aspartato- $^{14}\text{C}$  uniformemente marcado y  $\alpha$ -cetoglutarato por acción de la glutámico oxalacético transaminasa. El citrato radioactivo formado tras reacción con el acetyl CoA catalizado por la citrato sintasa se separa cromatográficamente del aspartato como se ha explicado en material y métodos. En el caso del citrato se puede usar tanto el medio de elución básico (n-propanol-amoniaco-agua 6:3:1) ó el ácido (sec butanol-acético-agua 6:1:2). La radioactividad se cuenta en un contador de radioactividad como se ha explicado en material y métodos.



**Fig. 12. Ensayo isotópico de la citrato sintasa. Dependencia del tiempo de incubación y de la concentración de enzima.** La mezcla de reacción está formada por trietanolamina pH 7 100 mM, aspartato 0,1 mM (300.000 dpm),  $\alpha$ -cetoglutarato 0,1 mM, glutámico oxalacético transaminasa 1 unidad, Tritón al 0,4%, acetil-CoA 60  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{l}$  (○) ó 20  $\mu\text{l}$  (●) respectivamente de la fracción particulada del hígado (30.000 g x 20 min) al 1/60.

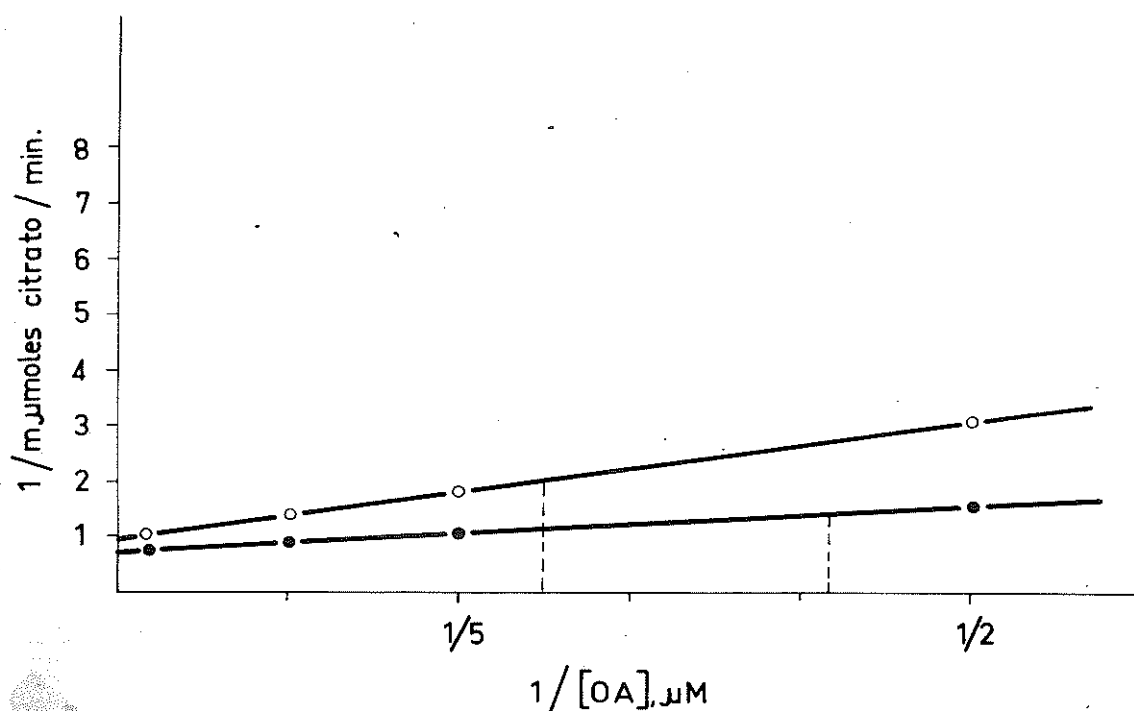


Como se observa en la figura 12 la cantidad de radioactividad medida como citrato es lineal con el tiempo y con la concentración de enzima. Los tubos testigos en donde se suprime el acetil CoA o el  $\alpha$ -cetoglutarato provocan la desaparición del citrato radioactivo hasta valores indetectables. Igual respuesta se observa cuando como fuente de enzima se añade citrato sintasa purificada de corazón de buey Sigma o Boehringer.

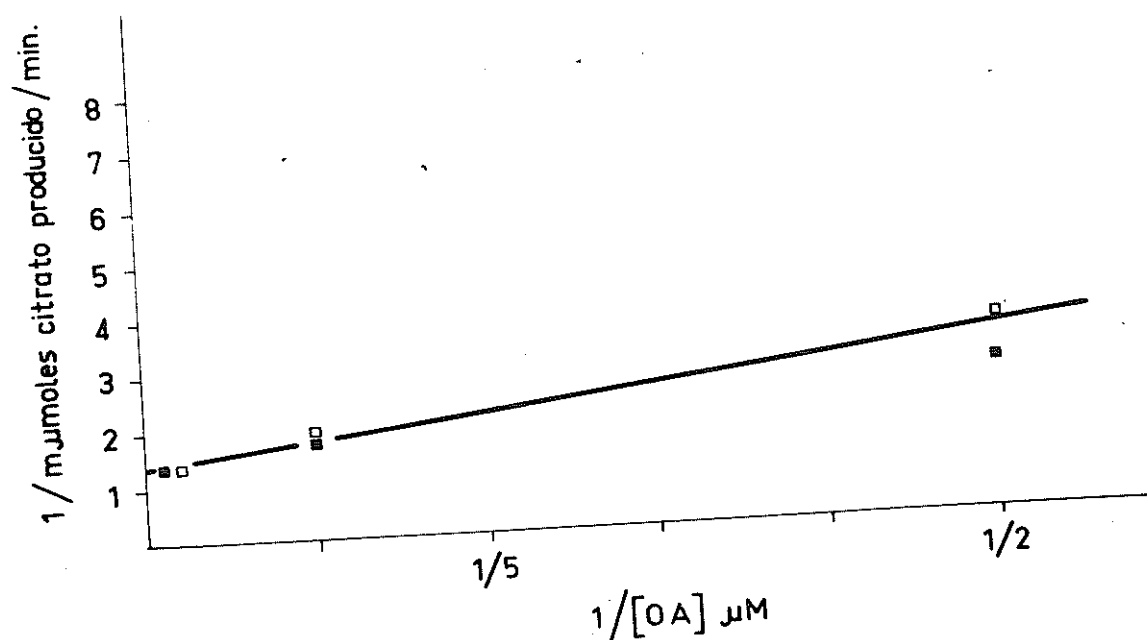
Con este método se ha medido la  $K_m$  para el oxalacetato de la citrato sintasa de hígado resultando muy baja, del orden de  $10^{-6}$  M. La presencia de sales KCl 0,1 M,  $MgCl_2$  5 mM y  $MnCl_2$  0,5 mM producen una pequeña disminución en la afinidad del enzima por su sustrato y en su velocidad máxima. (Fig. 13).

De los efectos reguladores descritos hasta el momento en las citrato sintasas de distintas procedencias: inhibición por palmitil-CoA (171),  $\alpha$ -cetoglutarato (178), ATP (57, 128) y DPNH (167), el primero se ha demostrado (143, 151) ser un efecto detergente inespecífico y ensayado por nosotros en preparaciones no purificadas no pudo ser encontrado; el segundo parece estar limitado a ciertas bacterias (168) y sólo el tercero ha sido defendido por Atkinson (3, 4) como de gran valor regulador para el ciclo de Krebs de una amplia serie de organismos entre ellos las células de los mamíferos. Sin embargo el efecto fundamental del ATP parece ser sobre la afinidad del acetil-CoA (57, 128) y como puede verse en la figura 14 apenas afecta la afinidad del enzima por el oxalacetato.

Quedaba por investigar la acción del DPNH sobre la citrato sintasa de hígado, pero al no tener una preparación purificada del enzima la málico deshidrogenasa abundantemente presente en la matriz mitocondrial interferiría con el ensayo. Por otro



**Fig. 13.  $K_m$  para el oxalacetato de la citrato sintasa de hígado.** La mezcla de reacción está compuesta por los mismos reactivos que los de la figura anterior. La gráfica de puntos llenos (●), corresponde a la reacción en ausencia de sales, de la que se puede calcular una  $K_m$  3  $\mu M$  y una  $V_{max}$  10,5 U/gr. Los círculos (o) corresponden a la reacción en presencia de KCl 0,1 M,  $MgCl_2$  5 mM y  $MnCl_2$  0,5 mM:  $K_m$  4  $\mu M$  y  $V_{max}$  8,2 U/gr.



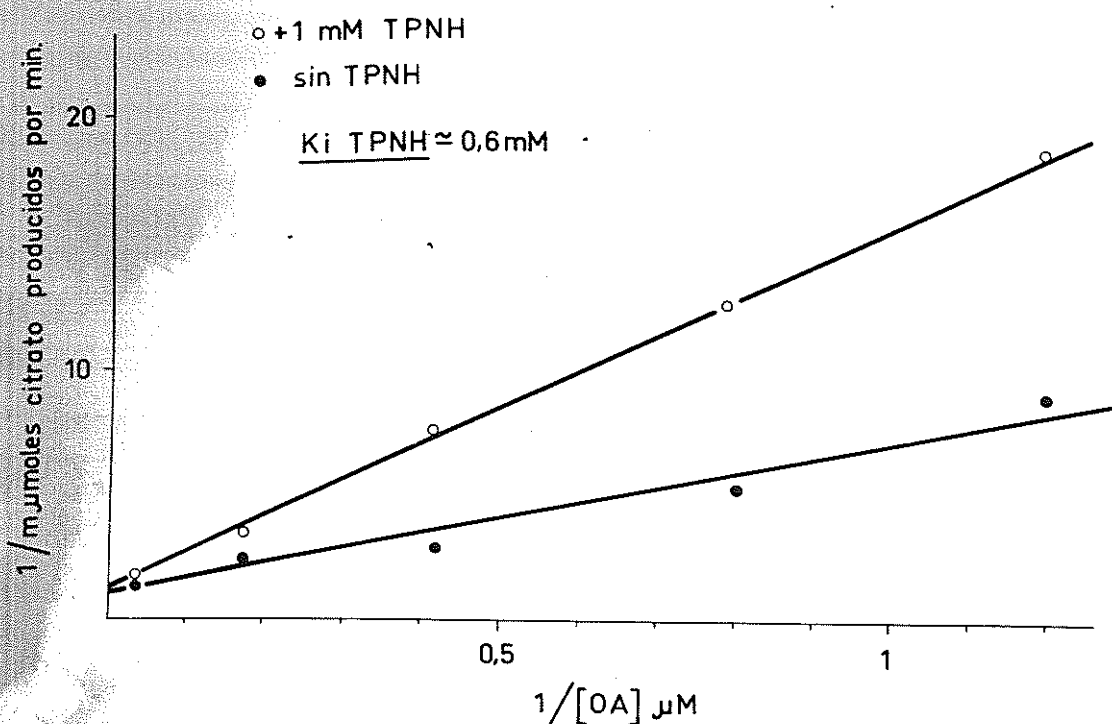
**Fig. 14. Efecto del ATP sobre la afinidad de la citrato sintasa de hígado por el oxalacetato.** Los resultados han sido obtenidos con la misma preparación enzimática y en las mismas condiciones que en las figuras 7 y 13 excepto por la adición de ATP 4 mM en presencia de KCl 0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  0,5 mM ( $\blacksquare$ ) o en su ausencia ( $\square$ ). La  $K_m$  es de  $3 \mu\text{M}$  y la  $V_{\text{max}}$  de 5,5 U/gr.

lado, la concentración de DPNH libre en el interior de la mitocondria no es muy grande (tabla 13) por lo que sólo un efecto muy marcado podría ser importante para la regulación de la citrato sintasa. Como el otro piridín nucleótido reducido, el TPNH no ofrecía ninguna de estas dificultades se ensayó con los resultados que aparecen en la figura 15. La  $K_i$  del TPNH de 0,6 mM aunque alta está en buena correlación con las concentraciones de este metabolito en las mitocondrias de hígado de rata (tabla 13). La ausencia de sales no modifica grandemente la respuesta del enzima frente al TPNH.

Aunque no hemos podido probar el DPNH frente a la citrato sintasa de mitocondria de hígado, los resultados de la figura 16 apoyan la interpretación del TPNH como posible efector. En esta figura se presentan los efectos del DPNH y TPNH sobre la citrato sintasa purificada de corazón de buey y no se pueden apreciar diferencias en el comportamiento frente a ambos nucleótidos. Nuestra interpretación hace uso del conocimiento que tenemos de las concentraciones libres de ambos metabolitos, que es de más de un orden de magnitud a favor del TPNH.

#### D. Propiedades cinéticas de la málico deshidrogenasa mitocondrial.

Aunque de este enzima se han hecho multitud de estudios cinéticos mucho más completos (30, 78, 111, 112, 113) que el que aquí presentamos, los datos conseguidos aquí han sido obtenidos a pH 7, cercano al fisiológico, para el que apenas existen datos, y con enzima de hígado de rata, que tampoco ha sido estudiado. El uso de la fluorometría al aumentar la sensibilidad nos ha permitido trabajar a unas concentraciones de sustratos en el



**Fig. 15. Efecto del TPNH sobre la afinidad de la citrato sintasa de hígado de rata por el oxalacetato.** La mezcla de reacción contenía imidazol HCl 40 mM, pH 7, aspartato (300.000 dpm) y  $\alpha$ -cetoglutarato para dar oxalacetato a las concentraciones que se indican en la figura, acetil-CoA 160  $\mu$ M, glutámico oxalacético transaminasa 1 unidad, KCl 0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  0,5 mM, Tritón 0,4% y 10  $\mu$ l de una preparación mitocondrial al 1/50.



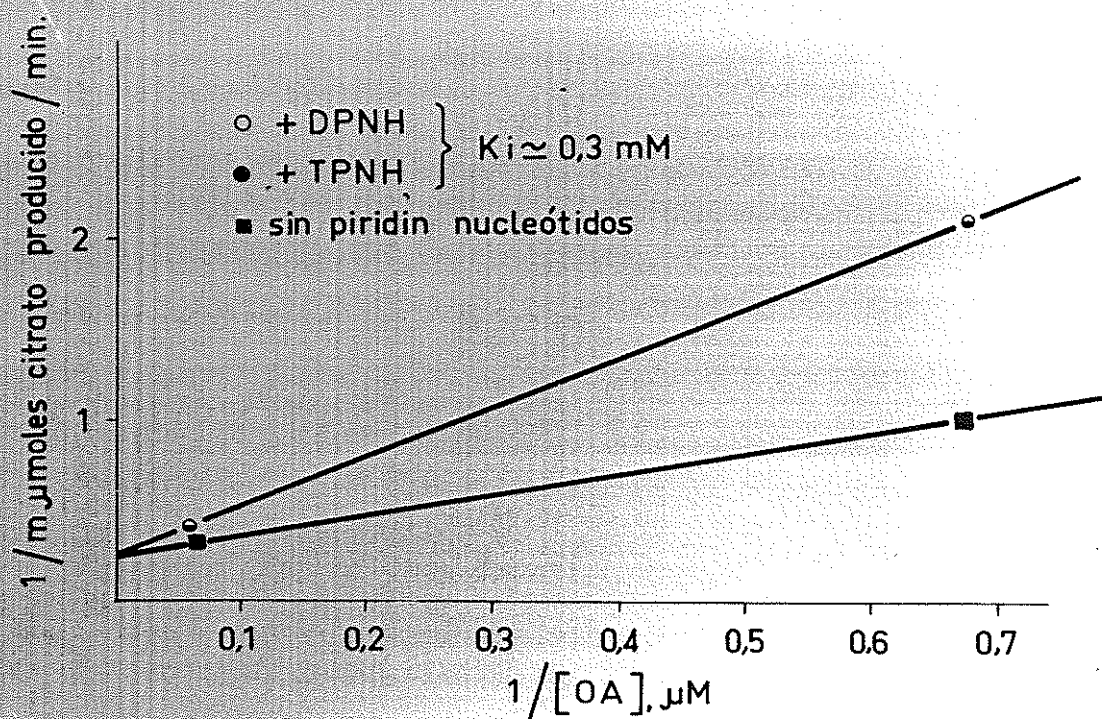
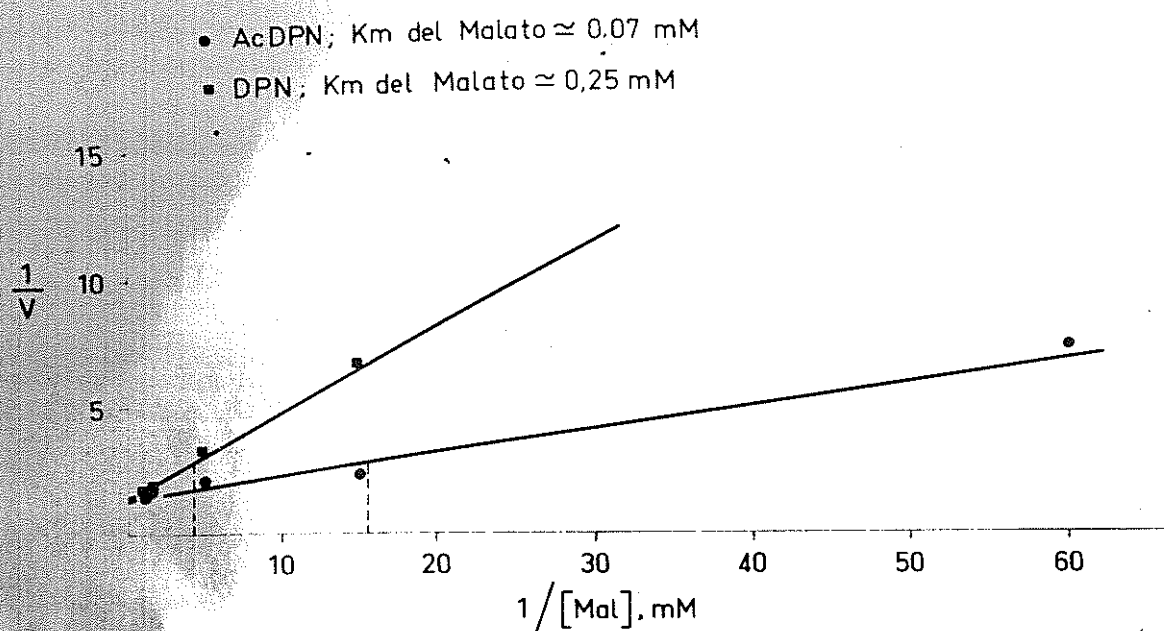


Fig. 16. Efecto del DPNH y TPNH sobre la citrato sintasa purificada de corazón de buay. Las mismas condiciones que en la figura 15 excepto que en vez de las mitocondrias se ha añadido citrato sintasa purificada.

caso del oxalacetato y DPNH mucho más bajas que las habituales en otros estudios cinéticos. Por otro lado ha permitido estudiar la reacción en la dirección malato  $\longrightarrow$  oxalacetato a pH 7 donde la irreversibilidad del enzima (el  $H^+$  interviene en la reacción y por tanto en el equilibrio) siempre ha puesto fuertes limitaciones.

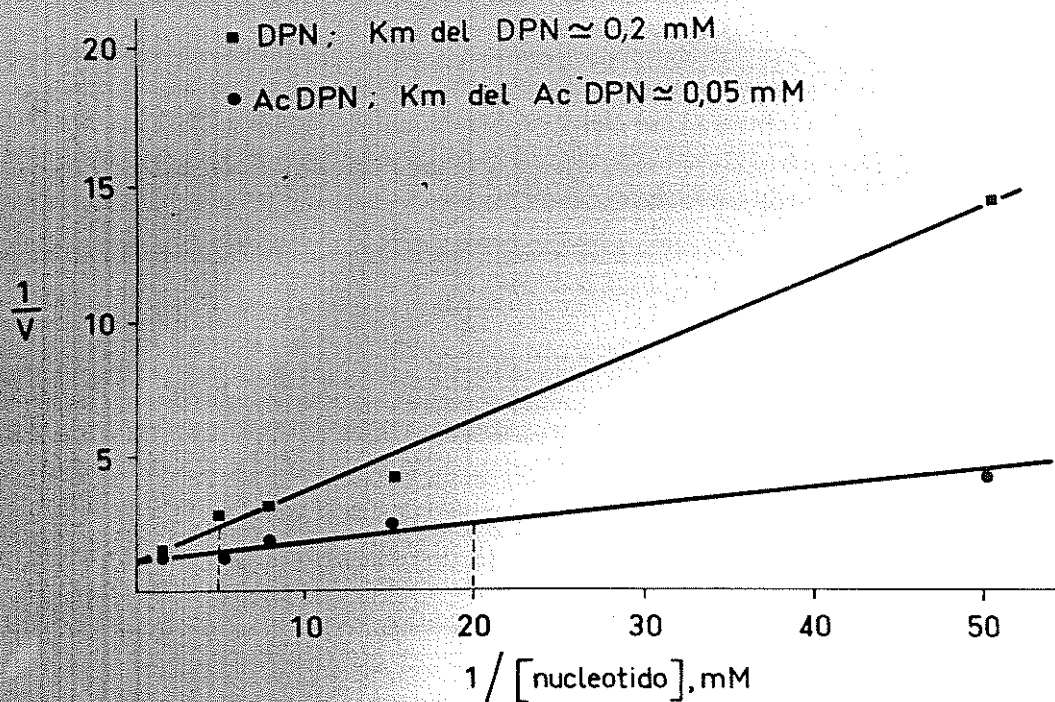
Para mejorar la sensibilidad se ha estudiado en paralelo usando como cosustrato el análogo acetilado del piridín nucleótido (AcDPN) y el propio DPN. En la figura 17 se puede ver que la  $K_m$  para el malato varía según el cosustrato empleado siendo más baja (0,07 mM frente a 0,25 mM) en el caso del análogo acetilado. En la figura 18 se presentan las  $K_m$  de los nucleótidos a concentraciones fisiológicas de malato, siendo también más baja la del AcDPN (0,05 mM) que la del DPN (0,2 mM), mientras que las velocidades máximas coinciden igualmente. Por otro lado en las figuras 19 y 20 pueden verse con algún detalle mayor las cinéticas a pH 7 de los sustratos oxalacetato y DPNH respectivamente, obteniéndose para el oxalacetato una  $K_m$  de 2  $\mu M$  y para el DPNH de 1,4  $\mu M$ . Como se observa en estas figuras todas las rectas se cortan en un punto, lo que ordinariamente se interpreta en el caso de las deshidrogenasas como consecuencia de su mecanismo ordenado de adición de los sustratos (82).



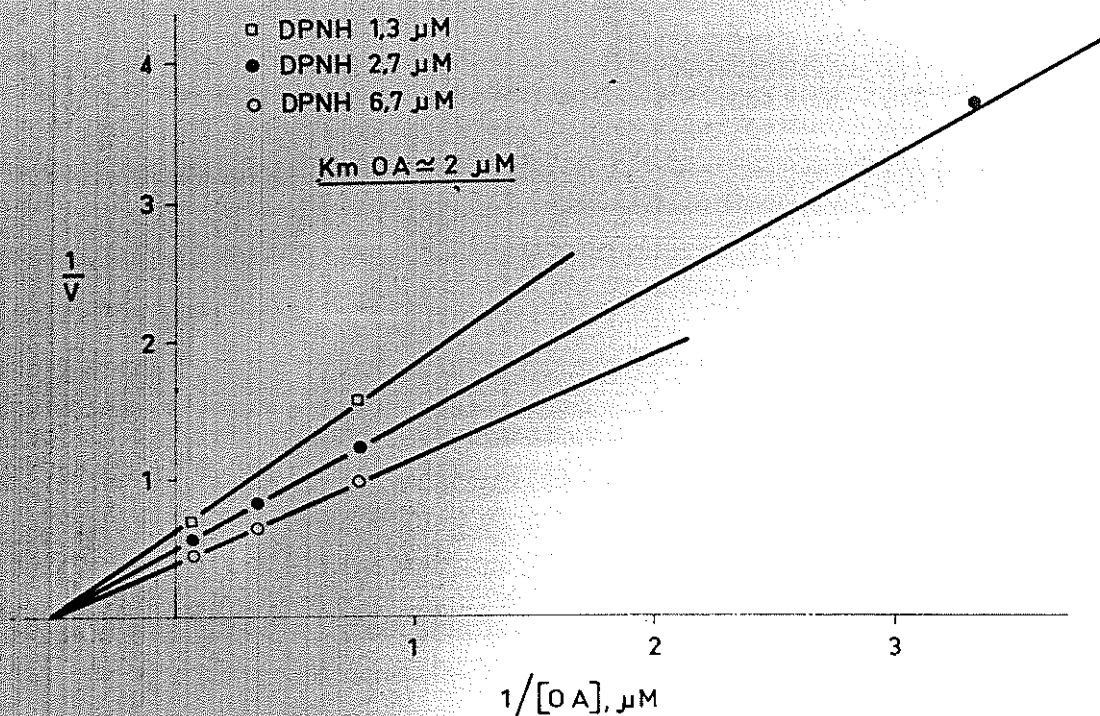
**Fig. 17. Mállico deshidrogenasa mitocondrial.  $K_m$  del malato.**

La reacción se midió en presencia de fosfato 20 mM pH 7, en un fluorómetro proporcional Beckman. El enzima proviene de una preparación de mitocondrias lavadas (obtenidas entre 600 g x 10 min y 8.000 g x 10 min, y lavadas 3 veces). La concentración de nucleótido es de 0,7 mM.

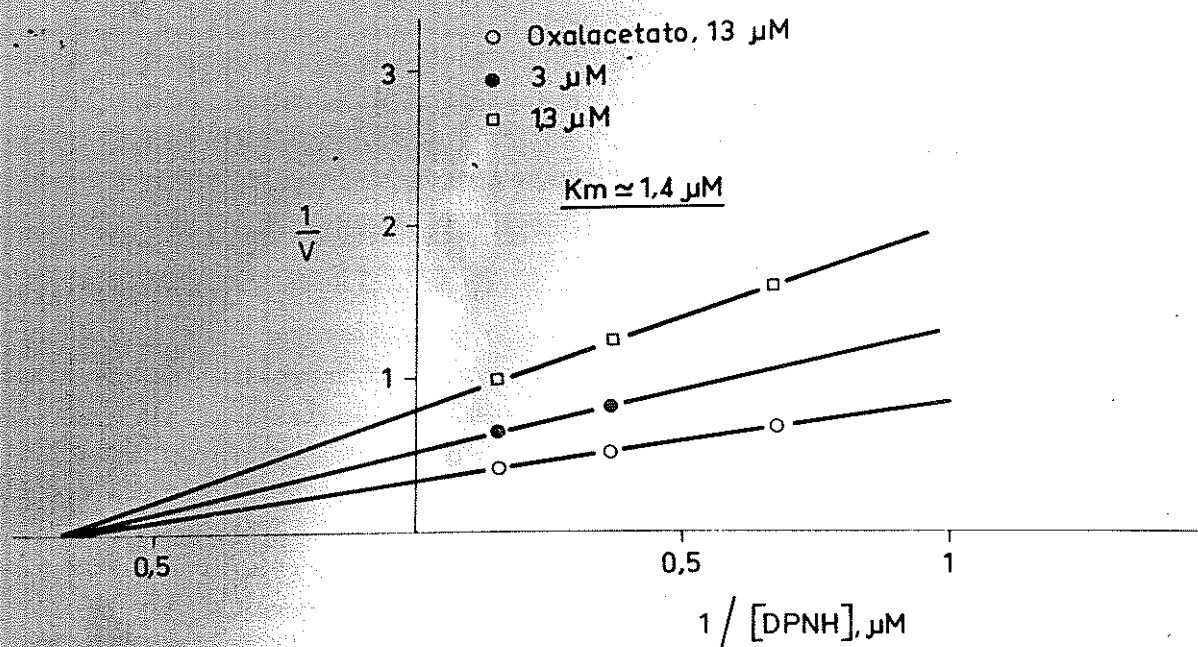




**Fig. 18. Málico deshidrogenasa mitocondrial.  $K_m$  del piridín nucleótido a pH 7.** Las condiciones son las mismas de la figura 17. La concentración de malato es 1,3 mM.



**Fig. 19. Málco deshidrogenasa mitocondrial. Cinética del oxalacetato a pH 7.** Las mismas condiciones de la figura 17, excepto que en lugar de malato y nucleótido oxidado se adicionan oxalacetato y DPNH en las cantidades indicadas.

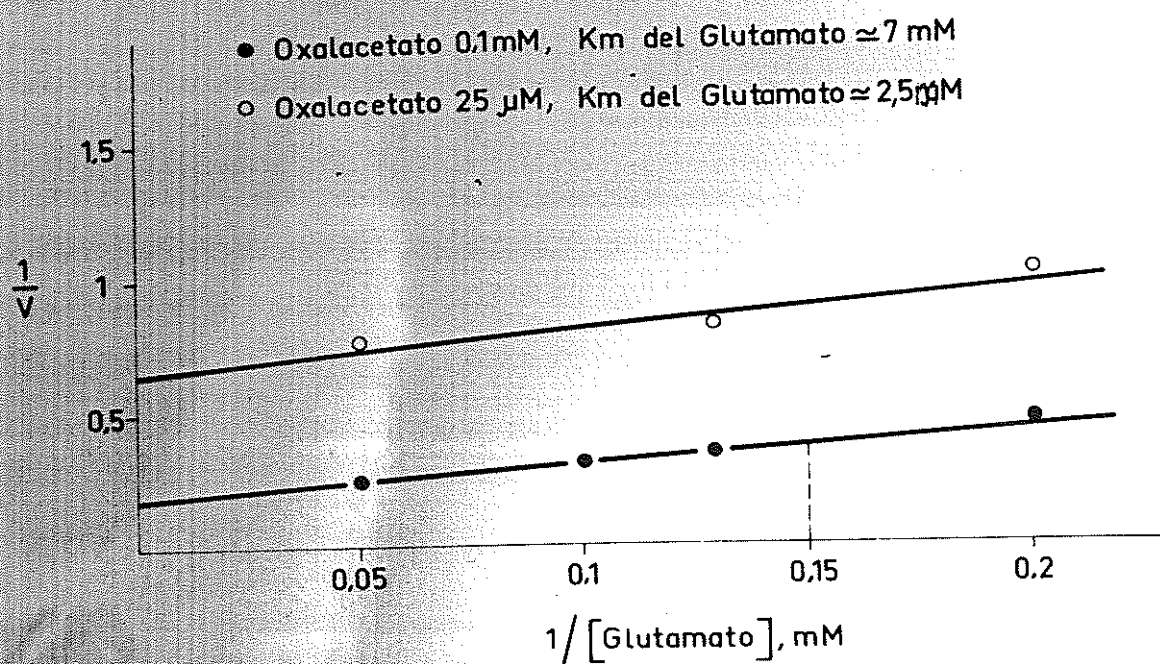


**Fig. 20. Malico deshidrogenasa mitocondrial. Cinética del DPNH.**  
**Las mismas condiciones de la figura 19.**

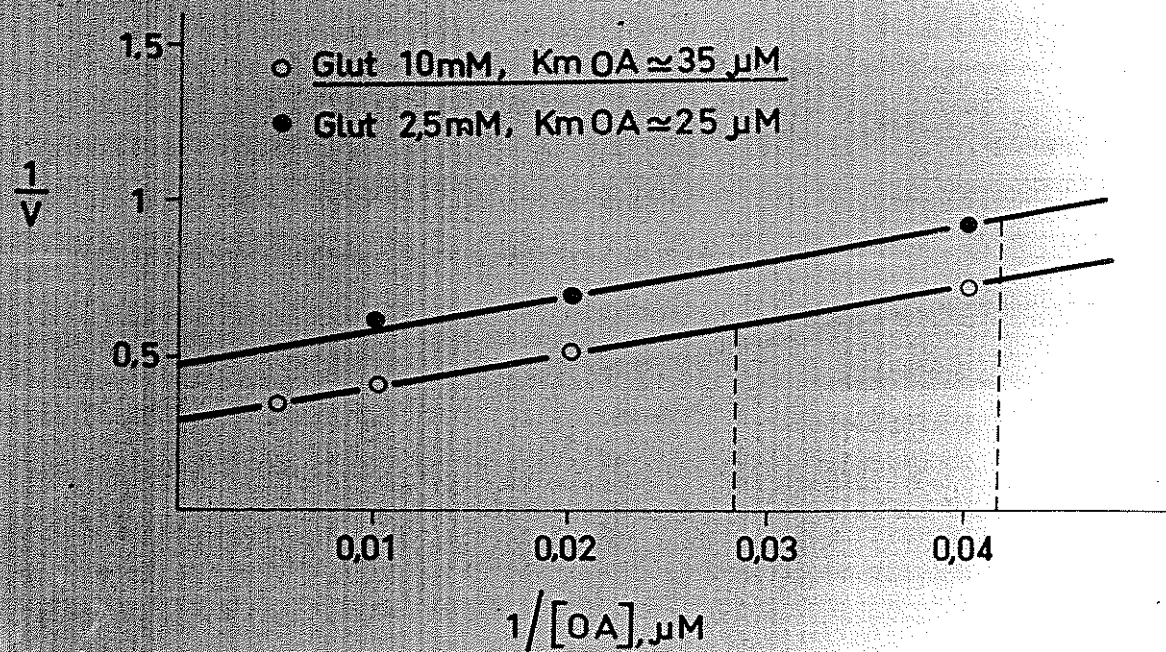


### E. Propiedades cinéticas de la glutámico oxalacético transaminasa mitocondrial.

De este enzima también se han hecho estudios cinéticos muy detallados (60, 162), pero no suelen abundar los datos obtenidos a pH 7, cercano al fisiológico, ni utilizando enzima procedente del hígado de rata. Los resultados obtenidos aparecen en las figuras 21, 22, 23 y 24. Se observa una típica cinética de paralelas, con  $K_m$  del orden de  $30 \mu\text{M}$  para el oxalacetato a concentraciones fisiológicas de glutamato (3-10 mM) y de 0,2 mM para el  $\alpha$ -cetoglutarato a concentraciones fisiológicas de aspartato (0,5-2 mM). Por otro lado las  $K_m$  del glutamato y aspartato indican que a concentraciones fisiológicas de su cosustrato estos dos sustratos se encuentran siempre a concentraciones cercanas a la saturación. La clara bidireccionalidad del enzima se prueba en que el enzima presenta velocidades máximas del mismo orden en ambas direcciones ( $V_{\text{max}} \text{ Glut } 10 \text{ mM} / V_{\text{max}} \text{ Asp } 2 \text{ mM} = 0,3$ ).

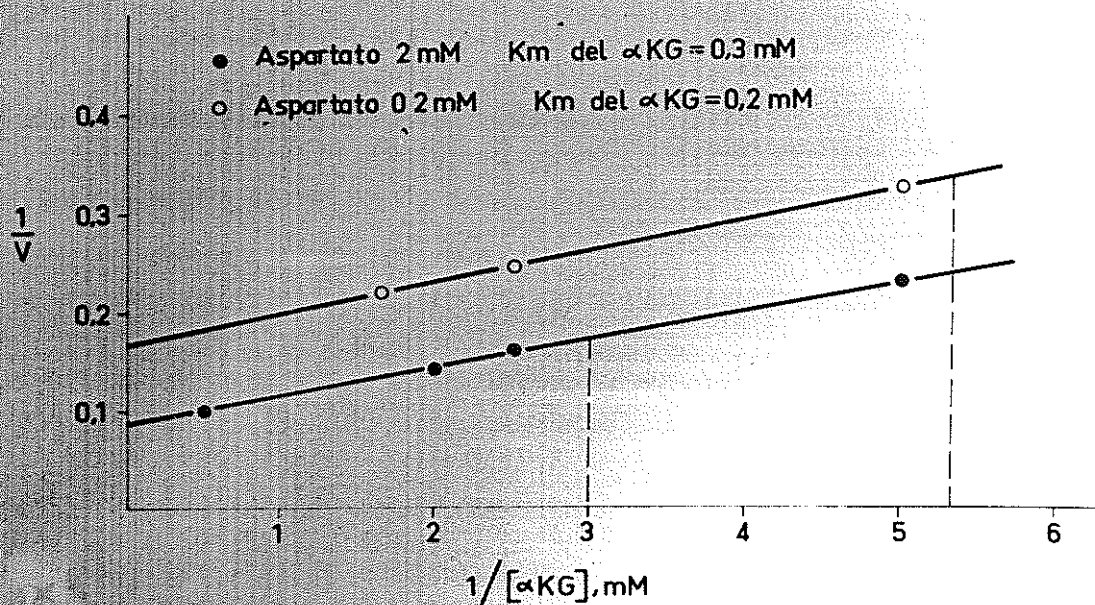


**Fig. 21. Glutámico oxalacético transaminasa mitocondrial.**  
**Cinética para el glutamato.** La preparación mitocondrial se preparó como se ha indicado en la figura 16 y se valoró como se describe en la sección de material y métodos.

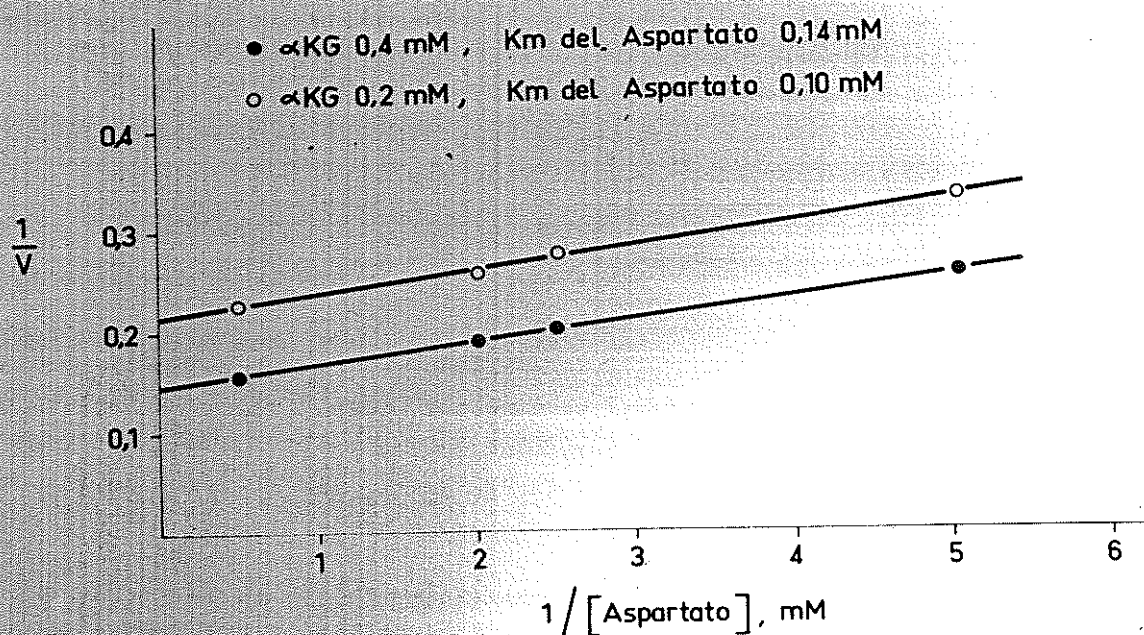


**Fig. 22. Glutámico oxalacético transaminasa mitocondrial.**  
**Cinética para el oxalacetato.** Se ensayó como  
en la figura 21.





**Fig. 23. Glutámico oxalacético transaminasa mitocondrial.**  
Cinética para el  $\alpha$ -cetoglutarato. La misma pre-  
 paración que la de la figura 21 se ensayó como  
 se indica en material y métodos.



**Fig. 24. Glutámico oxalacético transaminasa mitocondrial.**  
Cinética para el aspartato. Se ensayó como  
 se indica en la figura 23.



### 3. Enzimas de la encruclijada citoplasmática del oxalacetato

#### A. Variación de la actividad de los enzimas.

En la tabla 9 pueden verse los resultados de someter los animales a un fuerte estímulo gluconeogénico. El considerable aumento en los niveles de la fosfoenolpiruvato carboxikínasa es sin duda el resultado más llamativo. Este enzima es uno de los pocos de los que se sabe que pueden variar fuertemente de nivel en las células de mamíferos (133, 179), cambio que puede llegar a ser de unas 50 veces si se parte de un animal sometido a una dieta rica en glucosa en donde el enzima aparece con niveles aún más bajos (ver tabla 8). Estos cambios no llegan ni mucho menos a tener la magnitud de los que muestran los enzimas inducibles bacterianos (99) pero sin embargo son ya considerables, por lo que pueden jugar un papel importante en la regulación de esta encruclijada. Por lo que respecta a la glutámico oxalacético transaminasa su actividad también aumenta con el ayuno. La málico deshidrogenasa, un enzima que se encuentra con una enorme actividad, aumenta sólo ligeramente.

La variación de las proteínas solubles es mucho menor que la de las proteínas particuladas (tabla 7) lo que indica que existe una disminución neta de proteínas solubles (500 mg/hígado normal frente a 350 mg/hígado ayunado) mientras las proteínas particuladas totales del hígado se mantienen estacionarias (450 mg/hígado normal frente a 430 mg/hígado ayunado). Todo esto apoyaría el que las proteínas que se degradan para suministrar intermediarios para la gluconeogénesis son fundamentalmente solubles.



TABLA 9

Efecto del ayuno de 48 horas sobre los niveles (actividades medidas en condiciones saturantes) de los enzimas de la encrujillada citoplasmática del oxalacetato

	Dieta normal		Ayuno de 48 horas		Variación + %
	U/gr $\pm$ e.s.m.		U/gr $\pm$ e.s.m.		
Fosfoenolpiruvato carboxilasa	2,5 $\pm$ 0,3	(5)	18 $\pm$ 3	(5)	600
Malato deshidrogenasa	168 $\pm$ 20	(3)	271 $\pm$ 20	(3)	60
Glutámico oxalacélico transaminasa	9 $\pm$ 5	(3)	27 $\pm$ 7	(5)	200
Proteínas*	94 $\pm$ 4	(6)	118 $\pm$ 4	(8)	25
Hígado**	5,3 $\pm$ 0,2	(3)	3,0 $\pm$ 0,3	(3)	(-40)

Las cifras entre paréntesis corresponden al número de animales. Los hígados provienen de ratas hembras de unos 100 gr. de peso.

\* Expresadas en mg/gr de tejido.

\*\* gramos de tejido.

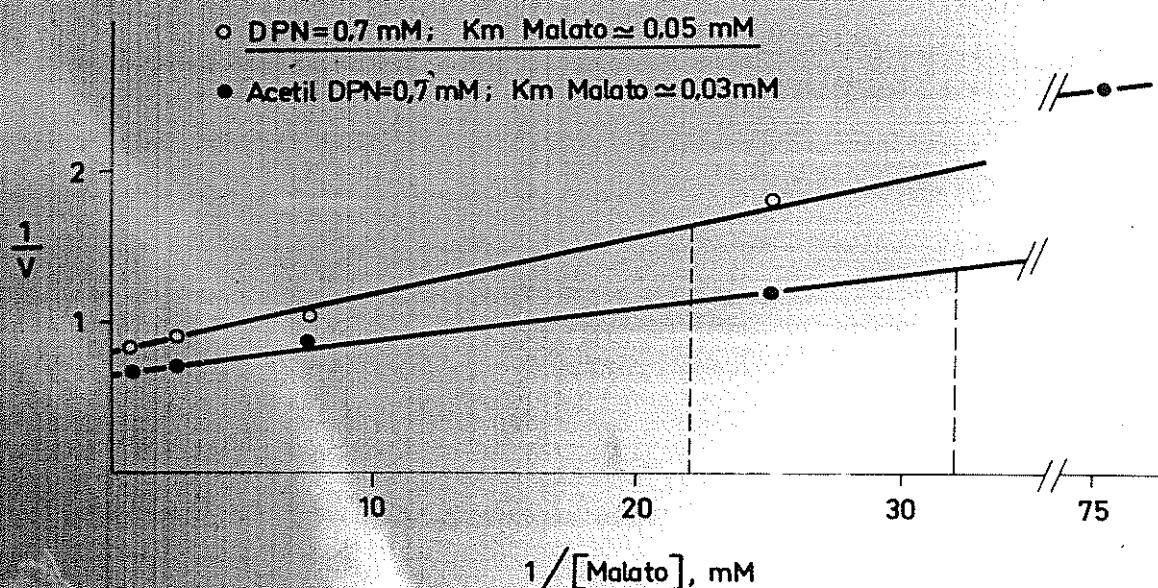
### B. Propiedades cinéticas de la málico deshidrogenasa citoplasmática.

En las figuras 25, 26, 27 y 28 se presentan las cinéticas frente al malato, DPN (AcDPN) oxalacetato y DPNH. De modo semejante a lo indicado en el caso del enzima mitocondrial, el interés de este estudio estriba en estar realizado con enzimas de hígado de rata y a pH 7, cercano al fisiológico. La  $K_m$  para el malato ( $\approx 40 \mu M$ ) es sólo un orden de magnitud mayor que la del oxalacetato ( $\approx 4 \mu M$ ) y la del DPN ( $\approx 50 \mu M$ ) casi dos órdenes de magnitud frente a la del DPNH ( $\approx 1 \mu M$ ). Por otro lado la relación de velocidades máximas es  $V_{max} (\rightarrow OA) / V_{max} (\rightarrow mal) \approx 0,05$ . Si se ponen en correlación estos valores con las concentraciones intracelulares libres de los sustratos, aparece claramente la bidireccionalidad de funcionamiento para la que está adaptado este enzima.

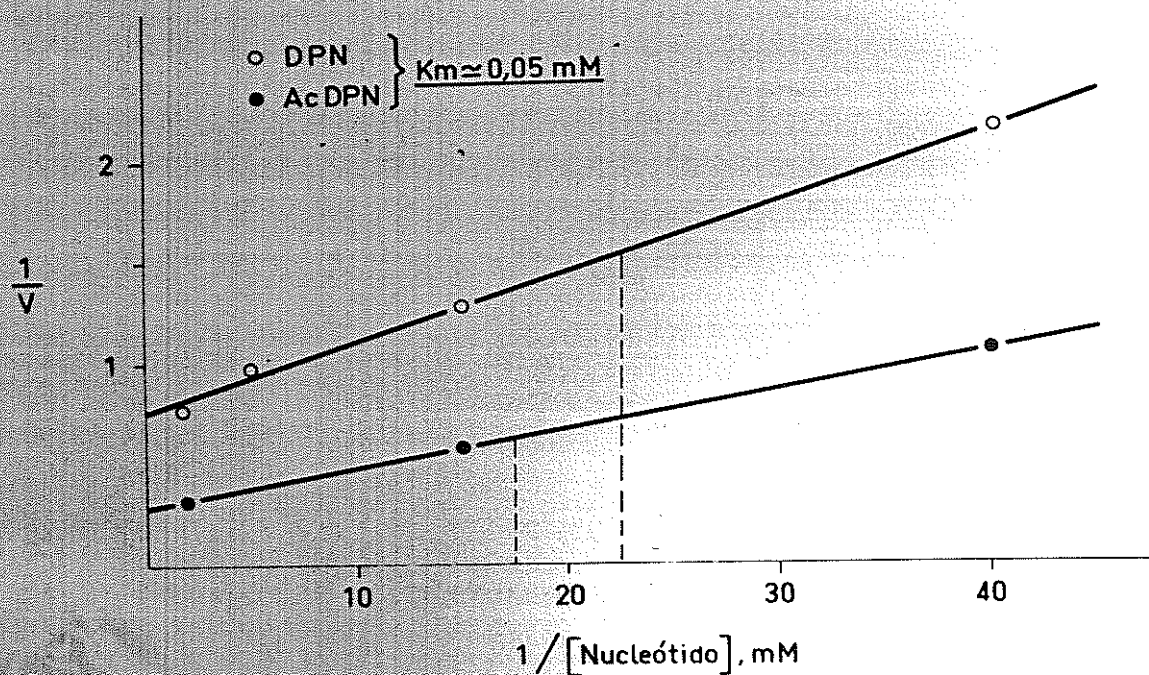
### C. Propiedades cinéticas de la glutámico oxalacético transaminasa citoplasmática.

Determinada igualmente a pH 7 y con el enzima de hígado de rata, presenta una cinética de paralelas con  $K_m$ s para los sustratos del orden de  $20 \mu M$  para el oxalacetato a concentraciones fisiológicas (2-3 mM) de glutamato (172), 1 mM para el glutamato a concentraciones fisiológicas (5-10  $\mu M$ ) de oxalacetato (174), 0.05 mM para el  $\alpha$ -cetoglutarato a concentraciones fisiológicas (0,1-0,5 mM) de aspartato y 1 mM para el aspartato a concentraciones fisiológicas (0,1-0,15 mM) del  $\alpha$ -cetoglutarato (173). Estos resultados pueden deducirse de las figuras 29, 30, 31 y 32.



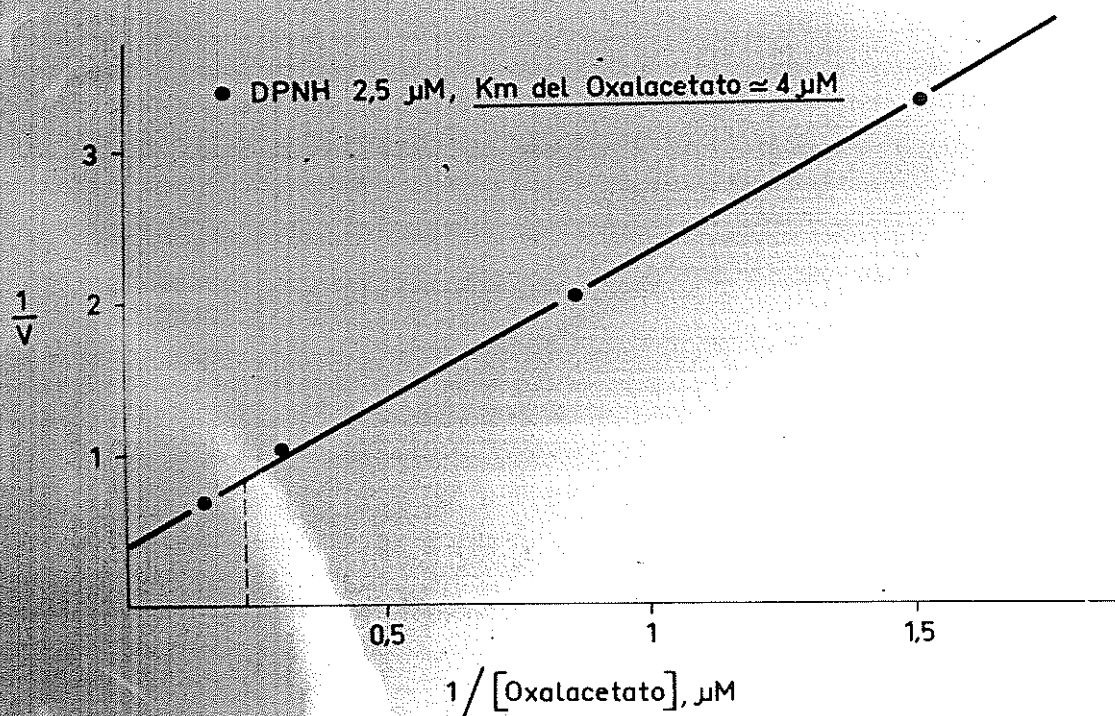


**Fig. 25. Málleo deshidrogenasa citoplasmática.  $K_m$  del malato.**  
 La reacción se llevó a cabo en un fluorómetro proporcional Beckman en presencia de un tampón fosfato potásico 20 mM a pH 7, con las cantidades indicadas de sustratos y 20  $\mu$ l de una preparación de citosol al 1/300. El citosol había sido obtenido después de una leve homogenización (dos pasadas en el Duall Grinder  $\approx$  15 seg.) para minimizar la rotura mitocondrial y una centrifugación a 105.000 g x 60 min.

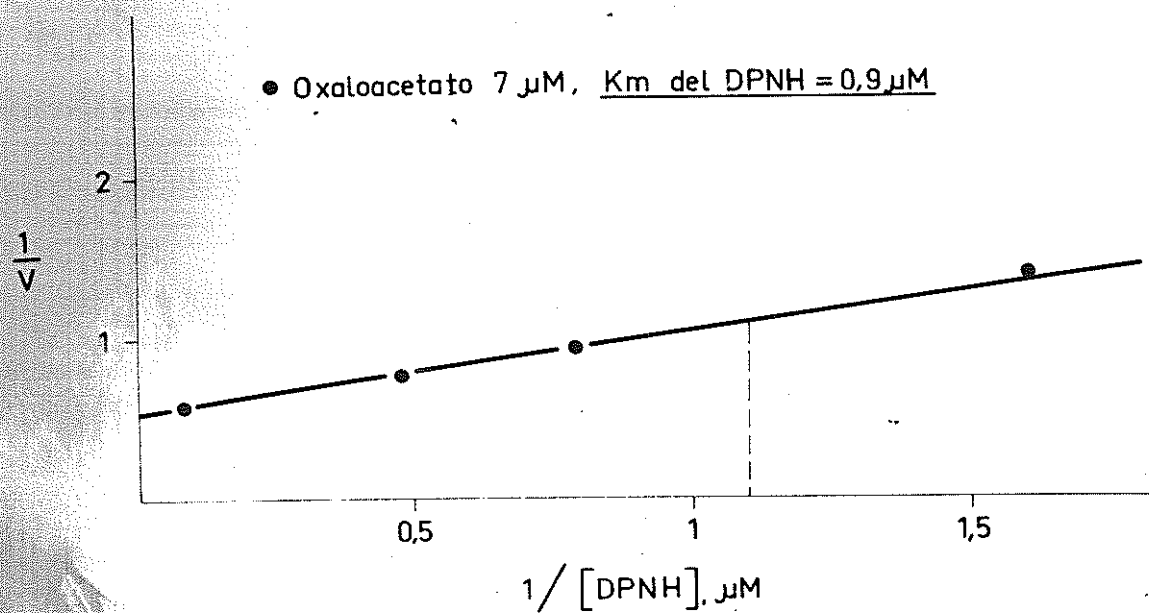


**Fig. 26. Malato deshidrogenasa citoplasmática.  $K_m$  del piridín nucleótido.** Las mismas condiciones que en la figura 23. La concentración de malato es de 0,3 mM.





**Fig. 27. Malato deshidrogenasa citoplasmática.  $K_m$  del oxalacetato.** Las mismas condiciones que en la figura 23, excepto que se utilizaron 10  $\mu$ l de la preparación de citosol al 1/3000, y oxalacetato y DPNH en lugar de malato y nucleótido reducido a las concentraciones indicadas en la figura.



**Fig. 26. Malato deshidrogenasa citoplasmática.  $K_m$  del DPNH.**  
**Las mismas condiciones que la figura 27.**



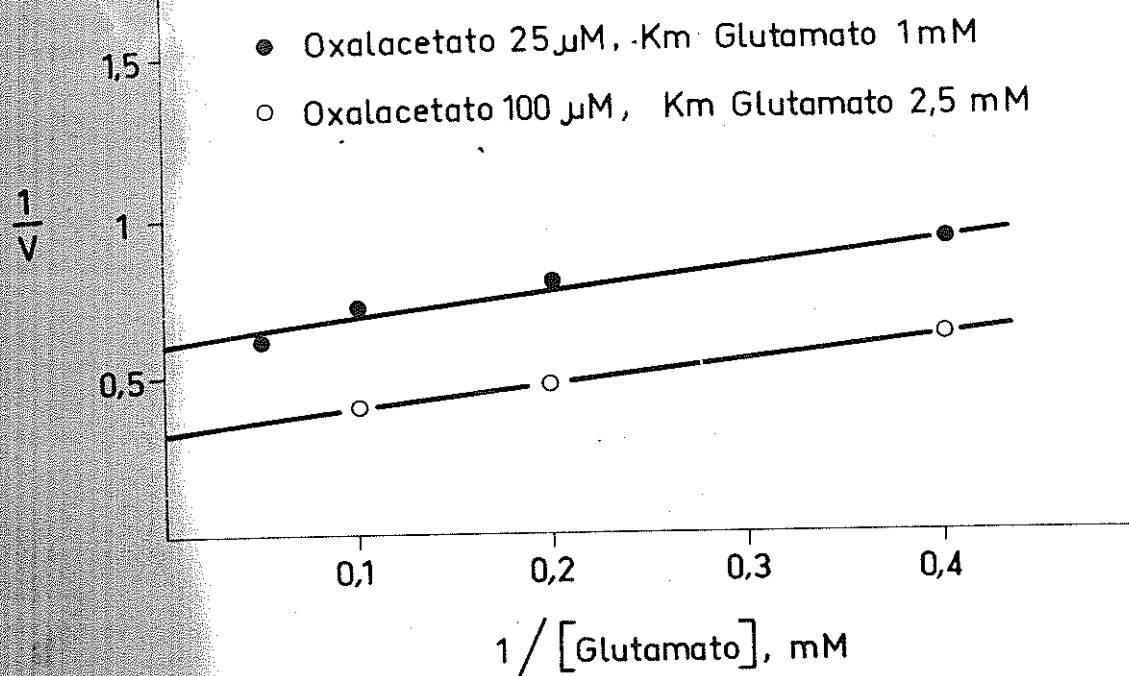
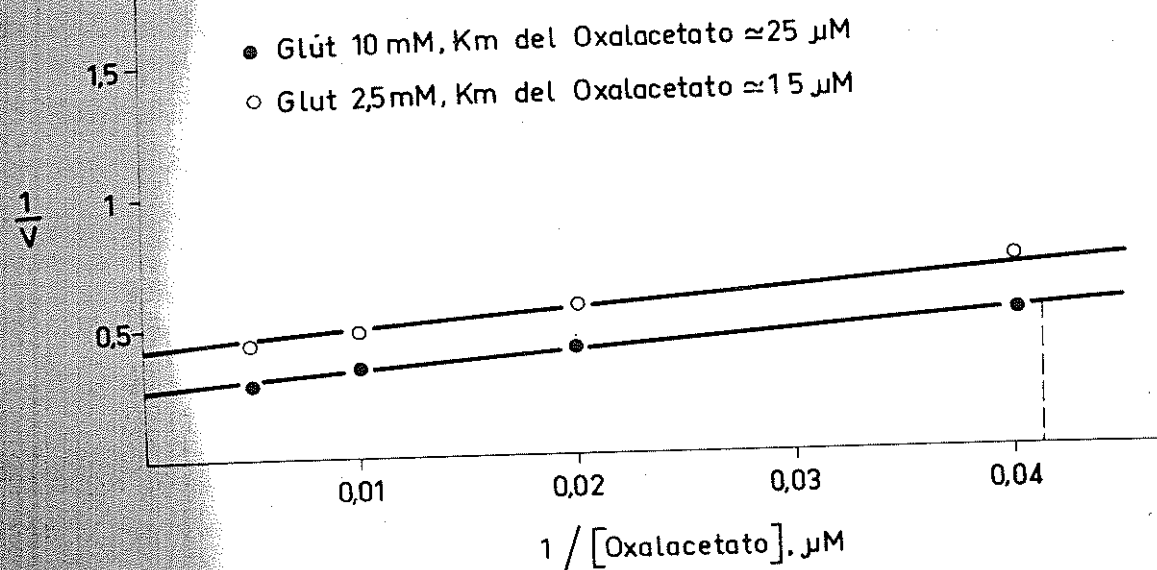
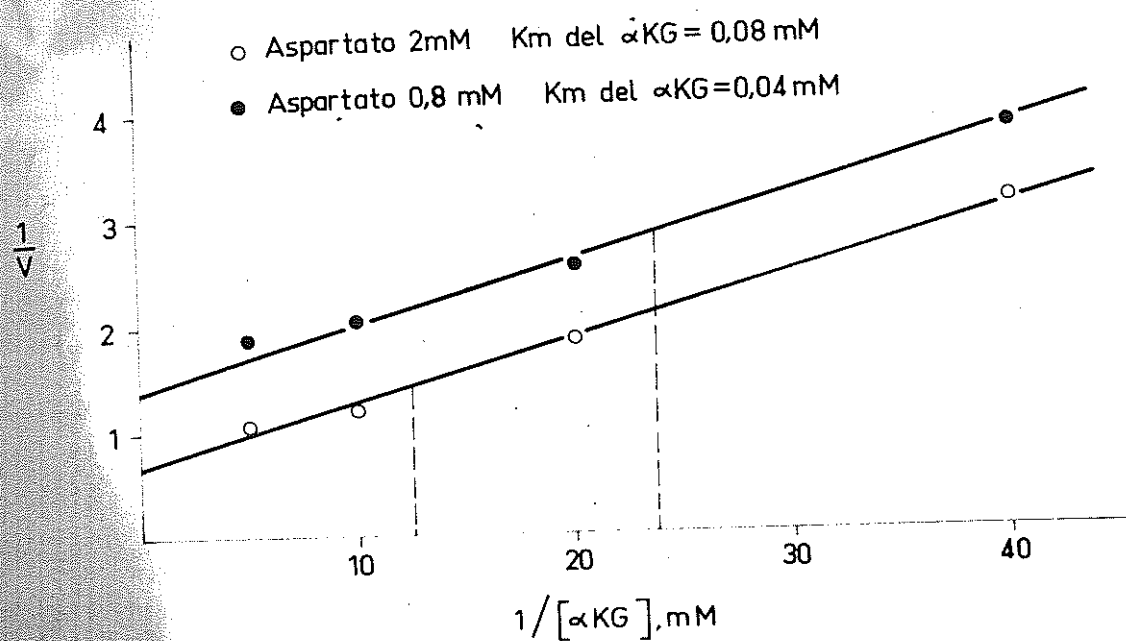


Fig. 29. Glutámico oxalacético transaminasa citoplasmática.  
Cinética para el glutamato. Se valoró con la misma preparación enzimática descrita en el pie de la figura 25 como se indica en material y métodos.



**Fig. 30. Glutámico oxalacético transaminasa citoplasmática.**  
Cinética para el oxalacetato. Las mismas condi-  
 ciones que la figura 29.



**Fig. 31. Glutámico oxalacético transaminasa citoplasmática.**  
Cinética para el  $\alpha$ -cetoglutarato. Las mismas con-  
 diciones que la figura 29.

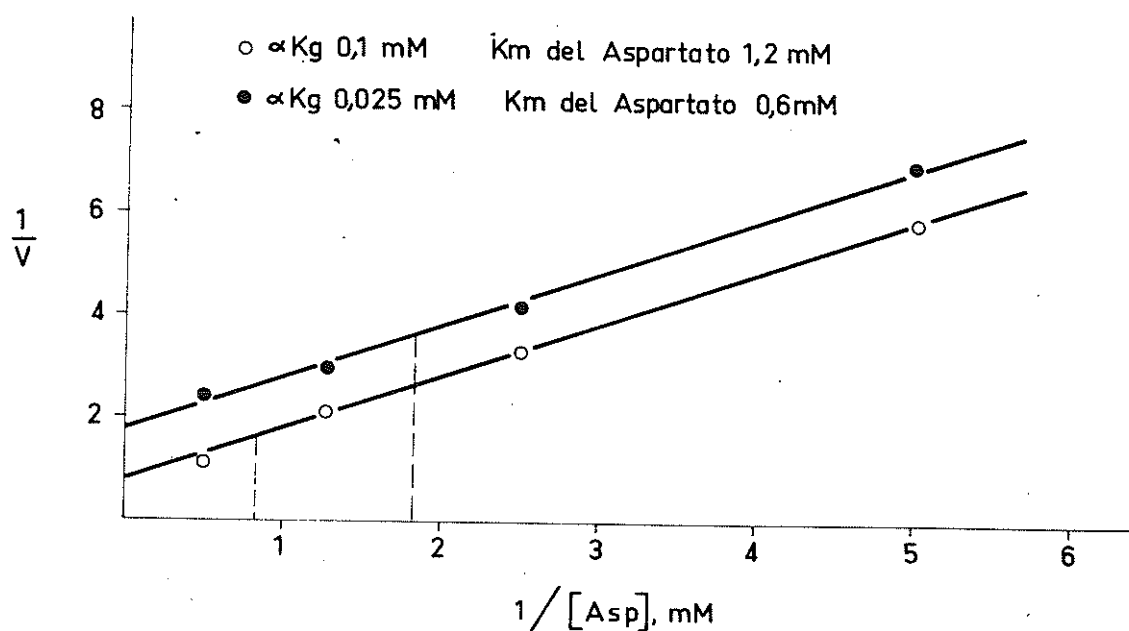
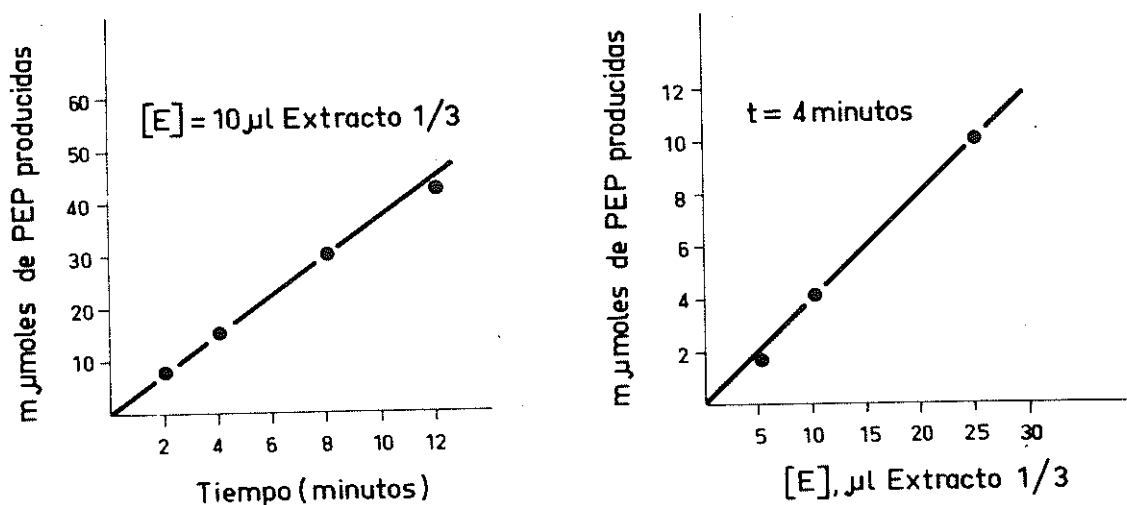
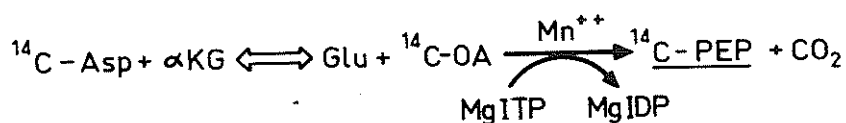


Fig. 32. Glutámico oxalacético transaminasa citoplasmática.  
Cinética para el aspartato. Las mismas condicio-  
 nes que la figura 29.

#### D. Propiedades cinéticas de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa.

El ensayo de este enzima en su dirección fisiológica de oxalacetato a fosfoenolpiruvato ha estado hasta este momento ligada a la determinación del fósforo  $\text{HgCl}_2$ -lábil, un método de poca sensibilidad. Teniendo en cuenta las bajas concentraciones fisiológicas de su sustrato, el oxalacetato, era interesante conseguir un método que permitiera trabajar a concentraciones bajas de oxalacetato y que fuera lo suficientemente específico para poder ser usado en preparaciones poco purificadas del enzima. Para ello se desarrolló un método análogo al presentado para la citrato sintasa, en donde el oxalacetato radioactivo producido a partir del aspartato uniformemente marcado, se le hacía reaccionar con el ITP y el fosfoenolpiruvato producido se separaba en cromatografía de papel con el eluyente n propanol-amoniaco-agua (6:3:1) y las radioactividades se medían en un contador de centelleo líquido. En la figura 33 se presentan los resultados obtenidos con este método que se puede ver allí que el fosfoenolpiruvato producido es proporcional a la concentración de enzima y al tiempo de incubación.

Desde casi el descubrimiento de este enzima (161) se venía hablando de su requerimiento por un metal divalente distinto del  $\text{Mg}^{++}$  y se suponía que el sustrato de la reacción podía ser el Mn-ITP en vez de Mg-ITP. En estos casos se colocaban en la mezcla de reacción concentraciones de  $\text{Mn}^{++}$  altas, semejantes a las concentraciones de ITP, que no eran fisiológicas. Cabía por otro lado la posibilidad de que el metal divalente fuese activador en un lugar distinto de la proteína que como cosustrato y para ello se probaron una serie de metales divalentes no en vez del



**Fig. 33. Ensayo isotópico de la actividad fosfoenolpiruvato carboxikinasa.** Dependencia del tiempo de incubación y de la concentración de enzima. El ensayo se realizó como se indica en material y métodos con una concentración de aspartato y  $\alpha$ -cetoglutarato de 3 mM y  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{MnCl}_2$  en concentraciones equimoleculares de 12 mM.



$Mg^{++}$  sino además del  $Mg^{++}$  a concentraciones más bajas (tabla 10). En ese experimento se puede ver que los metales divalentes a 0,6 mM en presencia de  $Mg^{++}$  12 mM se pueden dividir en cuatro grupos: uno fuertemente activador (2,5 veces) formado por el  $Mn^{++}$ ,  $Fe^{++}$  y  $Co^{++}$ , otro ligeramente activador formado por  $Zn^{++}$  y  $Cd^{++}$ , otro que no hace nada ( $Ni^{++}$ ,  $Sr^{++}$  y  $Ca^{++}$ ) y otro inhibidor ( $Cu^{++}$ ,  $Hg^{++}$ ,  $Sn^{++}$  y  $Pb^{++}$ ). En la figura 34 se presenta la dependencia con la concentración del metal activador, en la que puede verse que el orden de magnitud del efecto aunque no muy grande ocurre a concentraciones relativamente bajas (cercasas a las fisiológicas) de los metales activadores  $Mn^{++}$  y  $Fe^{++}$ .

Por tanto se adoptó como mezcla de ensayo standard una en la que se adicionaban  $Mg^{++}$  y  $Mn^{++}$  pero a concentraciones 4 y 0,4 mM respectivamente.

En la figura 35 se presentan las  $K_m$  para el oxalacetato del enzima proveniente de un hígado de rata normal y ayunada. No existen diferencias significativas en la  $K_m$  que es del orden de 0,2 mM y de acuerdo con los resultados de la tabla 9 un aumento en la actividad del enzima proveniente de la rata ayunada (8U/gr), en este caso medido en la dirección fisiológica, respecto a la normal (2 U/gr). En ambos casos el enzima presenta una cinética michaeliana típica. Tampoco aparecieron diferencias entre los enzimas de rata normal y ayunada medidos en reverso o con la reacción de intercambio entre  $CO_2$  y oxalacetato.

Como la concentración de ITP empleada en estos ensayos era de 2 mM y por tanto bastante mayor que la fisiológica, se exploró los posibles cambios en la  $K_m$  para el oxalacetato a distintas

TABLA 10

Fosfoenolpiruvato carboxikinasa y metales

Metales añadidos	Tanto por ciento de actividad en directo
$Mg^{++}$ 12 mM	100
" + $Mn^{++}$	260
" + $Co^{++}$	245
" + $Fe^{++}$	300
" + $Zn^{++}$	145
" + $Cd^{++}$	160
" + $Ni^{++}$	110
" + $Sr^{++}$	90
" + $Ca^{++}$	95
" + $Cu^{++}$	71
" + $Hg^{++}$	65
" + $Sn^{++}$	43
" + $Pb^{++}$	40

Todos los metales divalentes añadidos lo fueron en concentración 0,6 mM (excepto el  $Mg^{++}$ ) y en forma de cloruro (excepto el  $Pb^{++}$  que lo fue como acetato). La concentración de oxalacetato en la mezcla de reacción fue de 1,3 mM.

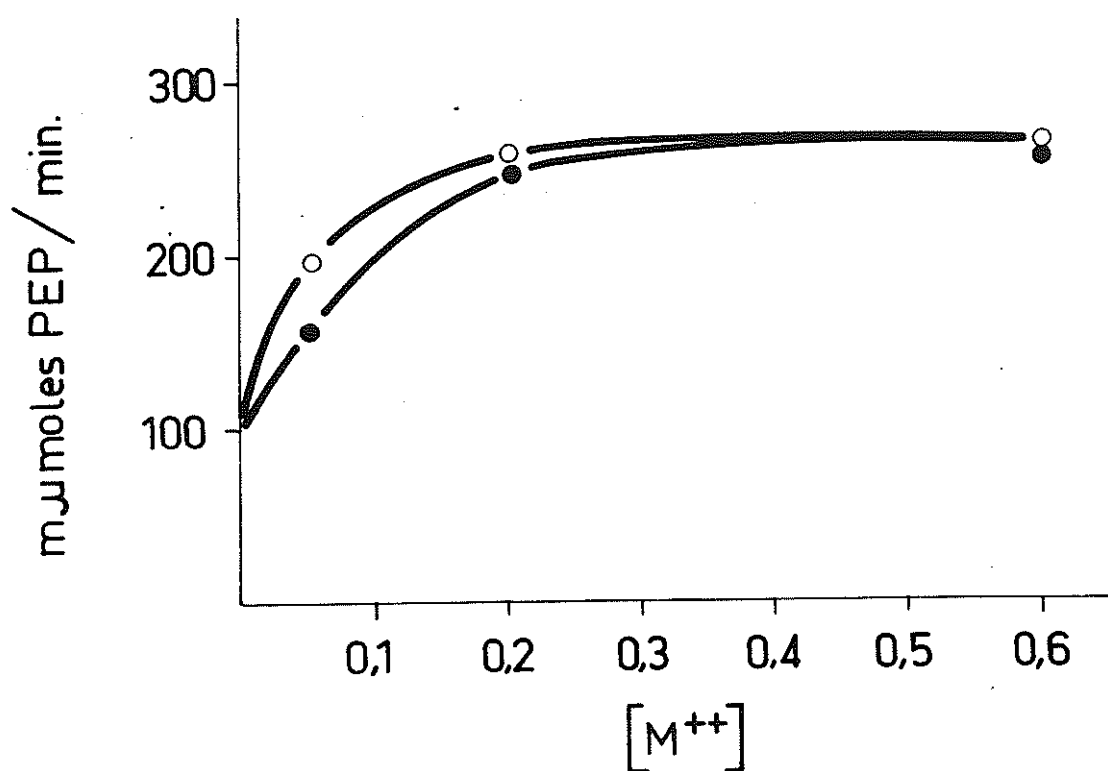
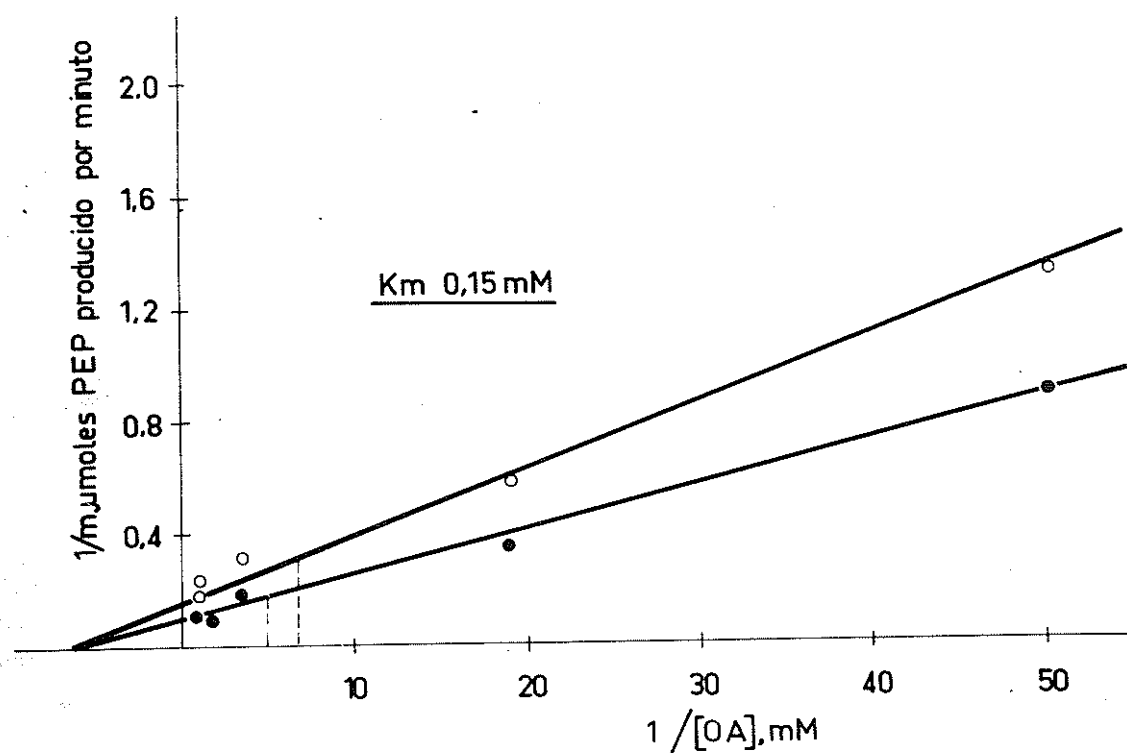


Fig. 34. Efecto de la concentración de metal activador sobreañadido  $Mg^{++}$  sobre la actividad en directo de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa. La reacción se llevó a cabo a pH 7 como se describe en material y métodos en presencia de  $MgCl_2$  12 mM y con una concentración de oxalacetato de 1,3 mM. (O)  $Fe^{++}$  y (●)  $Mn^{++}$ . El rango de la concentración de  $M^{++}$  es mM.



**Fig. 35. Fosfoenolpiruvato carboxilasa.  $K_m$  para el oxalacetato en distintos estados nutricionales de la rata.** Los puntos (●) corresponden a la rata ayunada 48 horas y se han obtenido con 5  $\mu\text{l}$  de un extracto al tercio ( $V_{\text{max}} = 8 \text{ U/gr. de hígado}$ ). Los círculos (○) corresponden a la rata normalmente alimentada y han sido obtenidos con 10  $\mu\text{l}$  de extracto al tercio ( $V_{\text{max}} = 2 \text{ U/gr. de hígado}$ ). La  $K_m$  en ambos casos es la misma (0,15 mM).

concentraciones de ITP. Los resultados aparecen en la figura 36, la  $K_m$  del oxalacetato no cambia al variar la concentración de ITP de 2 a 0,4 mM, lo que está de acuerdo con un mecanismo "random" de la reacción enzimática semejante al que se ha descrito para el enzima mitocondrial del pollo (41).

#### 4. La encrucijada del fosfoenolpiruvato y la piruvato kinasa

En los tejidos que tienen una cantidad fisiológicamente significativa de fosfoenolpiruvato carboxikinasa y en aquellas condiciones en que el flujo metabólico transcurre en la dirección oxalacetato a fosfoenolpiruvato, existe una encrucijada metabólica a nivel del fosfoenolpiruvato que si no existiera una estricta regulación de la piruvato kinasa el fosfoenolpiruvato formado sería rápidamente reciclado a piruvato.

##### A. Variación en el hígado de la actividad de los enzimas de la encrucijada.

En la tabla 11 pueden verse los cambios de actividad en la piruvato kinasa que no llegan a la mitad de la actividad existente, lo que por sí solo no puede explicar la regulación a nivel de esta encrucijada. Por otra parte el siguiente enzima irreversible de la encrucijada, la fructosa difosfatasa que tampoco varía, está separado del fosfoenolpiruvato por bastantes reacciones, lo que hace bastante difícil el que un simple aumento en la actividad de este enzima pudiera por sí solo explicar la regulación a nivel de esta encrucijada.

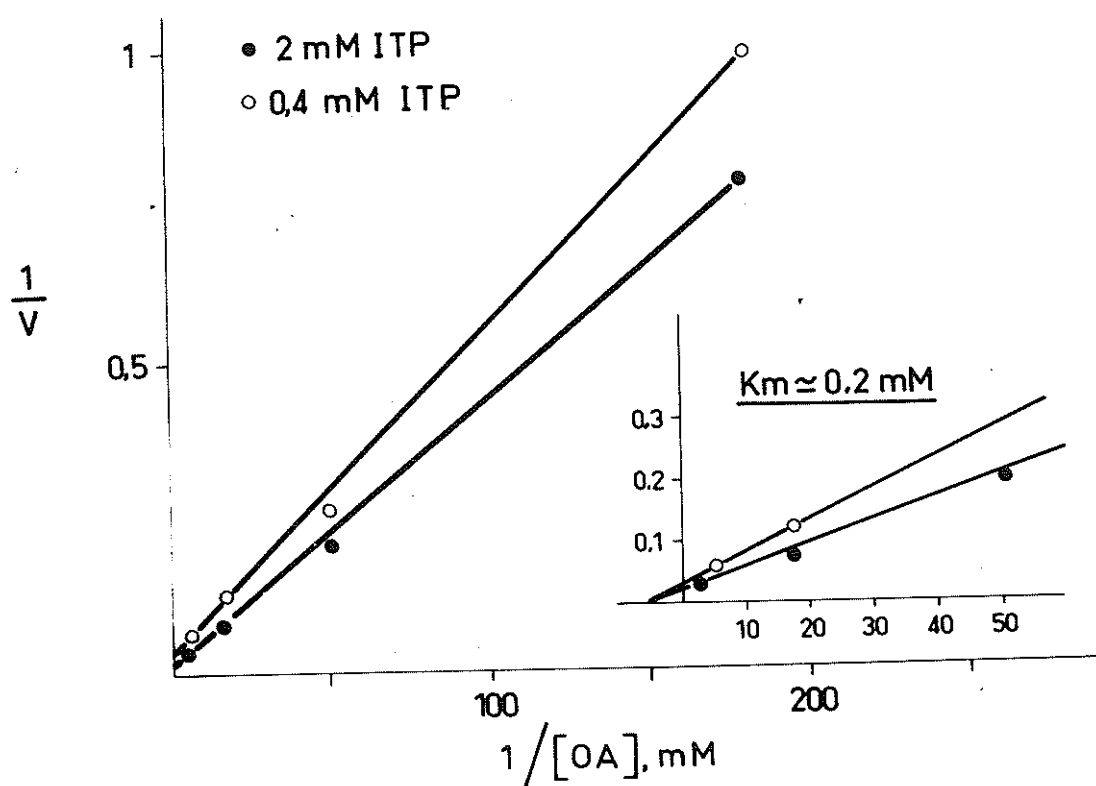


Fig. 36. Fosfoenolpiruvato carboxikinasa.  $K_m$  para el oxalacetato a distintas concentraciones del cosustrato ITP.  
 Extracto proveniente de una rata ayunada.



TABLA II

Efecto del ayuno de 48 horas sobre los niveles (actividades medidas en condiciones saturantes) de los enzimas de la encrucillada del fosfoenolpiruvato

	Normalmente alimentados	Ayuno 48 horas	% Variación
	U/gr $\pm$ e.s.m.	U/gr $\pm$ e.s.m.	
Piruvato kinasa	22 $\pm$ 2 (3)	13 $\pm$ 3 (3)	- 40
Enolasa <sup>2</sup>	21 $\pm$ 3 (3)	24 $\pm$ 5 (3)	-
Fructosa difosfatasa	10 $\pm$ 3 (3)	8 $\pm$ 2 (3)	-
Proteínas solubles <sup>*</sup>	94 $\pm$ 4 (6)	118 $\pm$ 4 (8)	+ 25

Las cifras entre paréntesis indican número de animales.

<sup>\*</sup>Expresadas en mg/gr de tejido.

### B. Propiedades cinéticas de la piruvato kinasa de hígado.

En 1966 Hess y colaboradores (61) describieron un efecto activador del FDP sobre la piruvato kinasa de levadura que fue extendido al poco tiempo a la piruvato kinasa de hígado por Taylor y Bailey (154). Sin embargo, existían ciertas incertidumbres en cuanto al papel fisiológico de este efecto. Por un lado el efecto era bastante pequeño en los extractos crudos ( $\approx 1,5$  de activación) e inconstante y sólo con la purificación se iba haciendo más marcado (146). Se han descrito un gran número de efectos a nivel de este enzima: activación por FDP (101, 154), glucosa 6-fosfato (165), gliceraldehído 3-fosfato (165) y fructosa 1-fosfato (33), inhibición por ATP (153),  $\text{Cu}^{++}$  (21, 101), alanina y prolina (127), DPNH, ácidos grasos libres, acetil-CoA y oxalacetato (165). Los presentes resultados ayudan a clarificar la regulación de este enzima.

En la figura 37 se presentan los resultados obtenidos con extractos crudos de hígado mantenidos a  $25^{\circ}$  durante aproximadamente media hora. Se obtiene una curva sigmoide de saturación para el PEP cuya sigmoicidad aumenta fuertemente en presencia de una concentración fisiológica de MgATP. La adición de FDP elimina la sigmoicidad de la curva de saturación frente al PEP como se puede comprobar en la representación de recíprocos que aparece en la figura. Sin embargo si los extractos se mantienen como es habitual en la práctica enzimológica a  $0^{\circ}$  (figura 38) existe una pérdida en los efectos descritos. Desaparece la sigmoicidad de la cinética frente al PEP y se atenúa el efecto inhibitor del ATP y el activador del FDP.

Este efecto de la temperatura de preincubación sobre el comportamiento cinético de la piruvato kinasa de los extractos

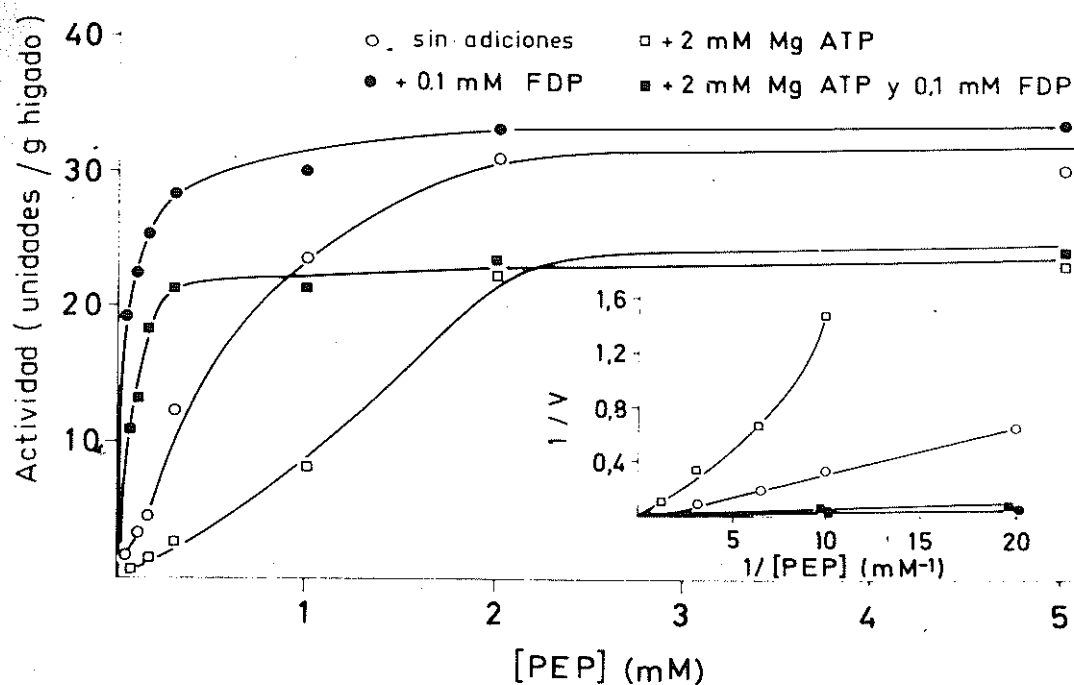
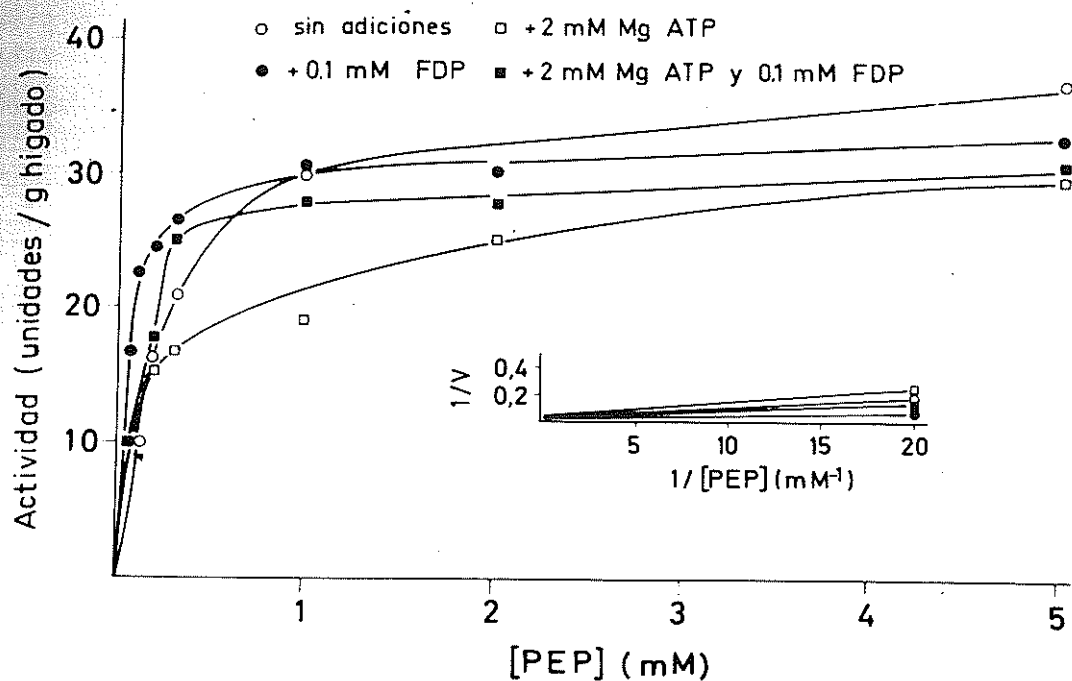


Fig. 37. Efecto del ATP y FDP sobre la cinética para el fosfoenolpiruvato de la piruvato kinasa de hígado de rata a pH 7. Los extractos se mantuvieron a 25° C durante media hora antes del ensayo. La actividad enzimática se ensayó del modo descrito en material y métodos, a 25° C.

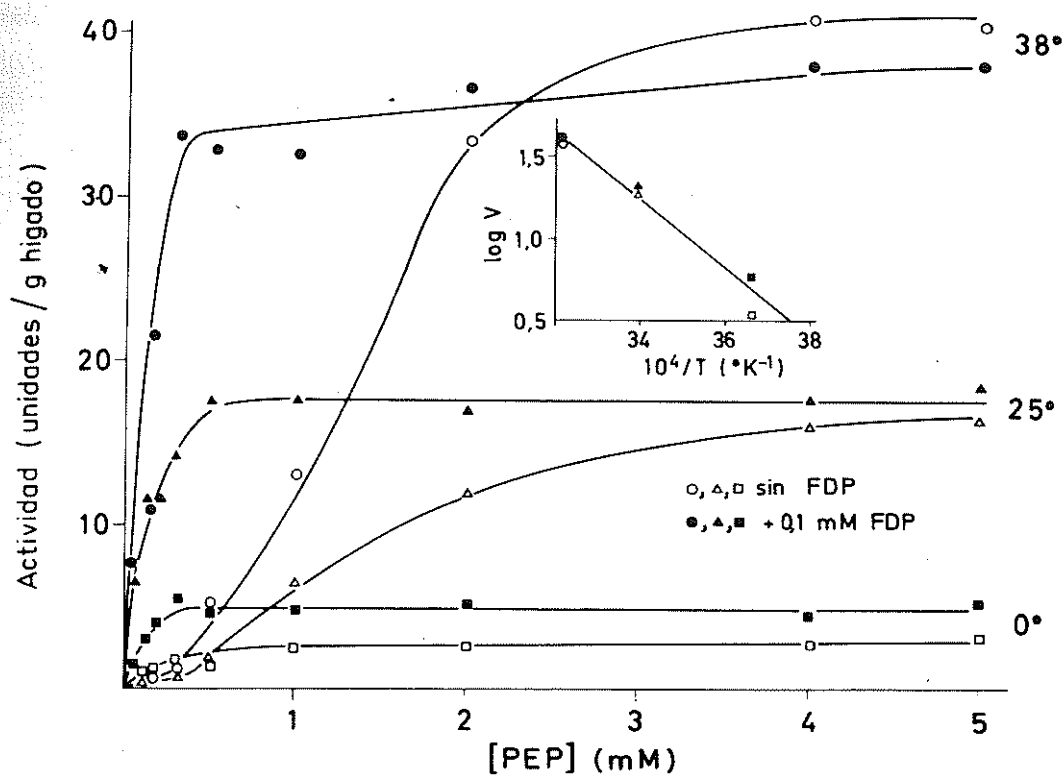


**Fig. 38. Efecto del enfriamiento previo sobre la cinética para el fosfoenolpiruvato de la piruvato kinasa de hígado de rata en presencia y ausencia de ATP y FDP a pH 7.** Las condiciones de ensayo son las mismas de la figura 37. El extracto se mantuvo en hielo.

crudos es totalmente reversible. Si se someten alternativamente al efecto del frío y del calor, los extractos pierden y recuperan la sensibilidad a los efectores. Los extractos necesitan 15 a 30 min para recobrar el comportamiento alostérico si se desenfriaban a temperatura ambiente. Si la temperatura era de  $37^{\circ}$  recuperaban mucho más deprisa la sensibilidad a los efectores. Si los extractos se obtienen a temperatura ambiente en lugar de en frío, la piruvato kinasa presenta el comportamiento alostérico descrito. Si el enzima se ensaya rápidamente tras una corta homogenización (2 a 3 minutos en total) el enzima presenta el comportamiento alostérico aunque la homogenización se haga en frío.

En la figura 39 se presenta el efecto de la temperatura sobre la actividad de la piruvato kinasa de los extractos crudos cuando tanto la preincubación como el ensayo se llevaron a cabo a la temperatura indicada. Las curvas en presencia de concentraciones fisiológicas de ATP eran sigmoides en el caso de los  $22^{\circ}$  y  $38^{\circ}$ . La curva a  $0^{\circ}$  no mostraba dicha sigmoicidad lo que producía que a concentraciones bajas de fosfoenolpiruvato la actividad fuera mayor a esa temperatura que a las más altas. La actividad en presencia de FDP por el contrario era hiperbólica en todos los casos. Como puede verse en la Tabla 12, los valores de los coeficientes de Hill (medida de la sigmoicidad de las curvas) eran semejantes a  $22^{\circ}$  que a  $38^{\circ}$ , mientras que su valor es 1 tanto para el enzima frío como cuando se midió en presencia de FDP, lo que indica cinética hiperbólica. Por el contrario el efecto de la temperatura sobre la velocidad máxima es completamente típico como puede verse en la figura 39, con un  $Q_{10}$  de 1,8 y una energía de activación de 9.200 calorías independientemente de la presencia de ATP o FDP.





**Fig. 39. Efecto de la temperatura sobre la cinética para el fosfoenolpiruvato de la piruvato kinasa de hígado en presencia de MgATP 2 mM a pH 7. Los signos blancos están obtenidos en ausencia de FDP, los negros en presencia de FDP 0,1 mM. La temperatura indicada en la gráfica corresponde tanto a la temperatura de preincubación de los extractos como a la de ensayo. El ensayo a temperatura de 0° - 2° se realizó con un espectrofotómetro en el interior de una cámara fría a esa temperatura.**

TABLA 12

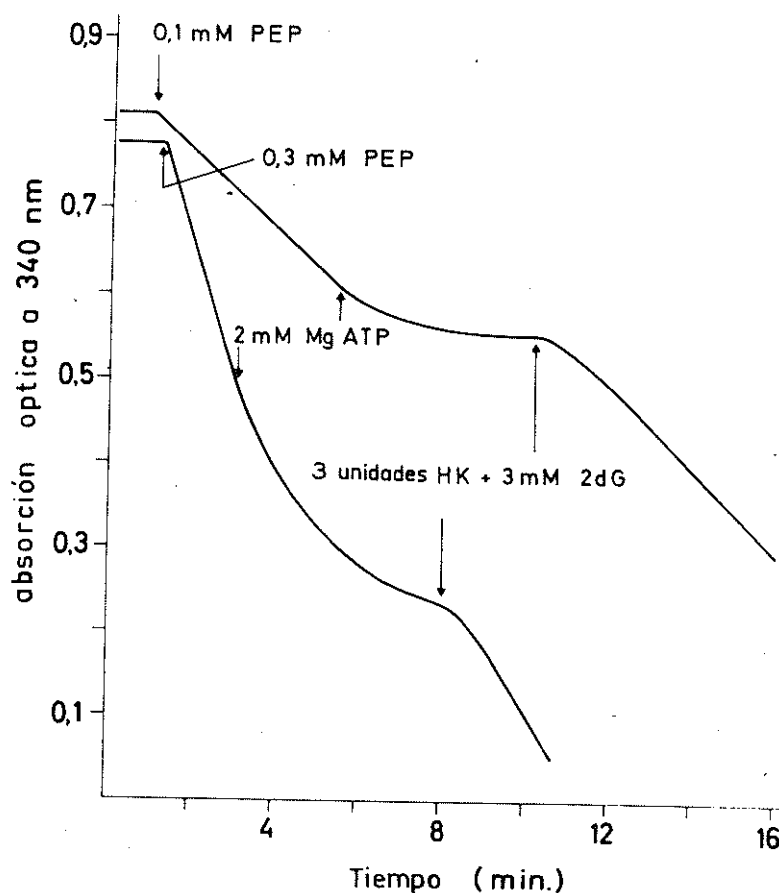
Cooperatividad de la piruvato kinasa de hígado

Coeficientes de Hill (n) correspondientes a las cinéticas para el fosfoenolpiruvato

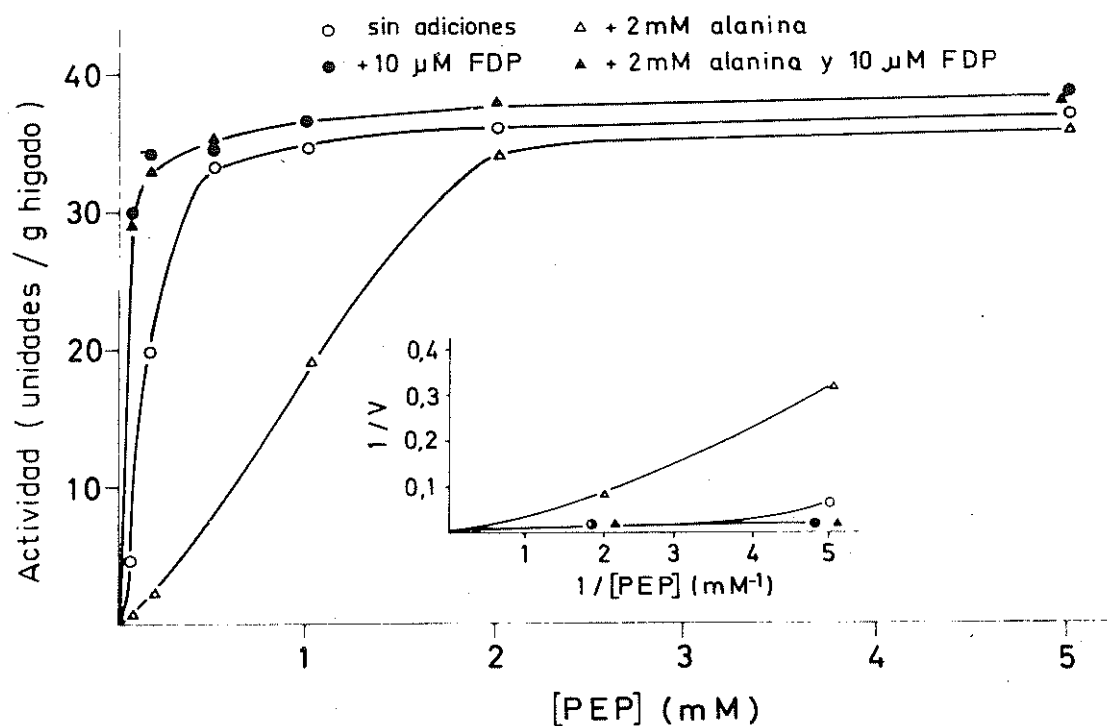
Efectores añadidos	Temperatura		
	38° C	25° C	0° C
Ninguno	1,3	1,2	0,9
MgATP (2 mM)	1,8	1,8	1,0
FDP (0,1 mM)	-	1,0	-
MgATP (2 mM) + FDP (0,1 mM)	-	0,9	-

La figura 37 presenta los efectos que concentraciones fisiológicas de ATP producen sobre la cinética de la piruvato kinasa cuando los extractos se mantienen a temperatura ambiente ó a 37°. En ella y en la tabla 12, puede verse que este nucleótido aumenta la sigmoicidad de la cinética para el fosfoenolpiruvato y que este efecto es completamente contrarrestado por la presencia del activador FDP. Por otro lado los resultados de la figura 40 señalan que efectivamente es el ATP libre o complejo el causante de la inhibición puesto que la adición de 2-deoxiglucosa y hexokinasa que lo transforman en ADP, contrarresta completamente dicha inhibición.

La alanina es también un inhibidor de la piruvato kinasa de hígado como puede verse en las figuras 41 y 42. De modo semejante al ATP, esta inhibición se ejerce especialmente a concentraciones bajas, fisiológicas, del sustrato fosfoenolpiruvato, aumentando la sigmoicidad de su cinética. Los datos de la figura 42 indican que las concentraciones de ambos inhibidores ATP y alanina para producir un 50% de inhibición son de 0,5 y 0,1 mM respectivamente, claramente inferiores a las fisiológicas de estos dos metabolitos: 0,5 a 1,5 mM para la alanina (172) y entre 2 y 3 mM para el ATP (16). En la figura 42 puede observarse asimismo el efecto del frío sobre la respuesta de la piruvato kinasa a estos inhibidores. De una serie de aminoácidos, glicina, histidina, fenilalanina, serina y  $\beta$ -alanina, sólo la fenilalanina presentó efectos inhibidores claros. La serina (figura 42) es levemente inhibidora. El lactato no tuvo efecto inhibidor, así como tampoco el DPNH a concentraciones de 0,05 hasta 0,5 mM.



**Fig. 40. Efecto de la adición de hexokinasa más 2-deoxiglucosa sobre la inhibición por ATP de la piruvato kinasa de hígado.** La temperatura de ensayo es de  $25^{\circ}$ . Los extractos fueron mantenidos a  $36^{\circ}$  durante  $1/2$  hora antes del ensayo. Las flechas indican el momento en que se hicieron las diferentes adiciones. HK es abreviatura de hexokinasa y 2DG de 2-deoxiglucosa.



**Fig. 41. Efecto de la alanina y de la FDP sobre la cinética para el fosfoenolpiruvato de la piruvato kinasa de hígado.** El enzima se ensayó como se describe en material y métodos a pH 7 y después de preincubar los extractos a 38° durante media hora.



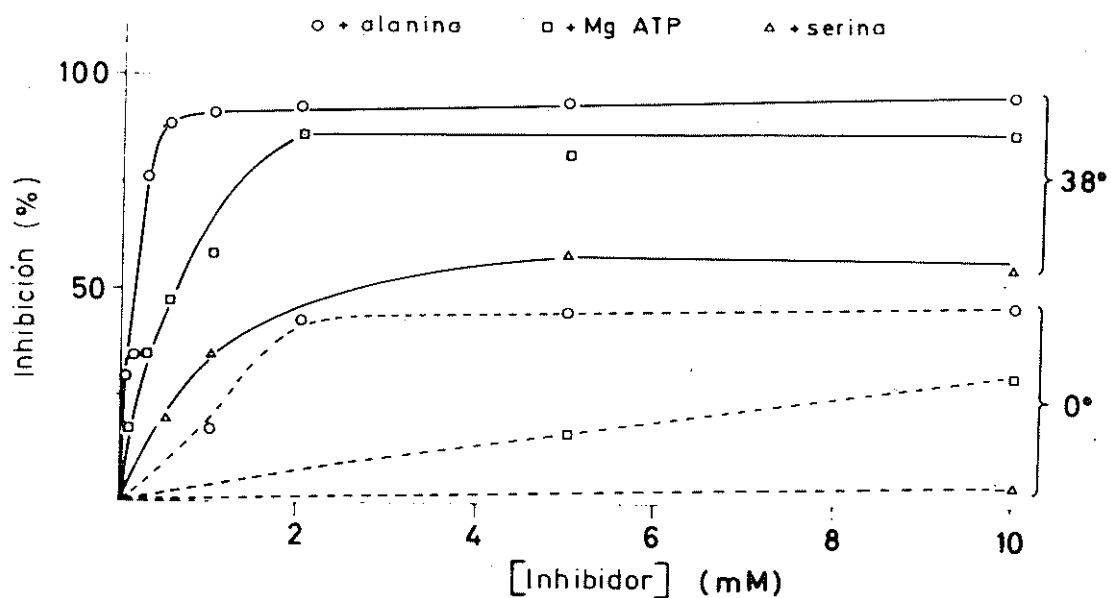


Fig. 42. Efecto de la concentración de ATP y alanina sobre la actividad de la piruvato kinasa de hígado de rata. El enzima se ensayó según se indica en material y métodos, con fosfoenolpiruvato 0,3 mM y los extractos se preincubaron a 38° media hora (línea continua) o a 0° (línea de trazos).

Aunque en algunos de los experimentos anteriores, las concentraciones de fructosa difosfato utilizadas son altas (0,1 mM) en la figura 43 puede verse que la afinidad del enzima por su activador es tan grande como la que se ha encontrado con el enzima purificado (146): 0,5  $\mu$ M es suficiente para dar una activación casi completa. Sin embargo en presencia de concentraciones fisiológicas de los inhibidores la concentración para una activación del 50% aumenta hasta 1  $\mu$ M y 3  $\mu$ M en presencia de concentraciones fisiológicas de uno o los dos inhibidores respectivamente.

#### C. Propiedades cinéticas de la piruvato kinasa de riñón.

Susor y Rutter (146) indicaron que la piruvato kinasa de los extractos de riñón de rata no era sensible a FDP, esto planteaba un problema evidente ya que el riñón es el segundo órgano gluconeogénico en los mamíferos. Los resultados de la figura 44 indican que electivamente los extractos de corteza renal de rata dan cinética sigmoide en presencia de ATP y la FDP contrarresta este efecto. Aún más marcado es el efecto de la alanina como puede verse en la figura 45 en donde la piruvato kinasa de un extracto total de riñón presenta una fuerte inhibición por alanina a concentraciones fisiológicas de este aminoácido, inhibición que es completamente contrarrestada por FDP 10  $\mu$ M.

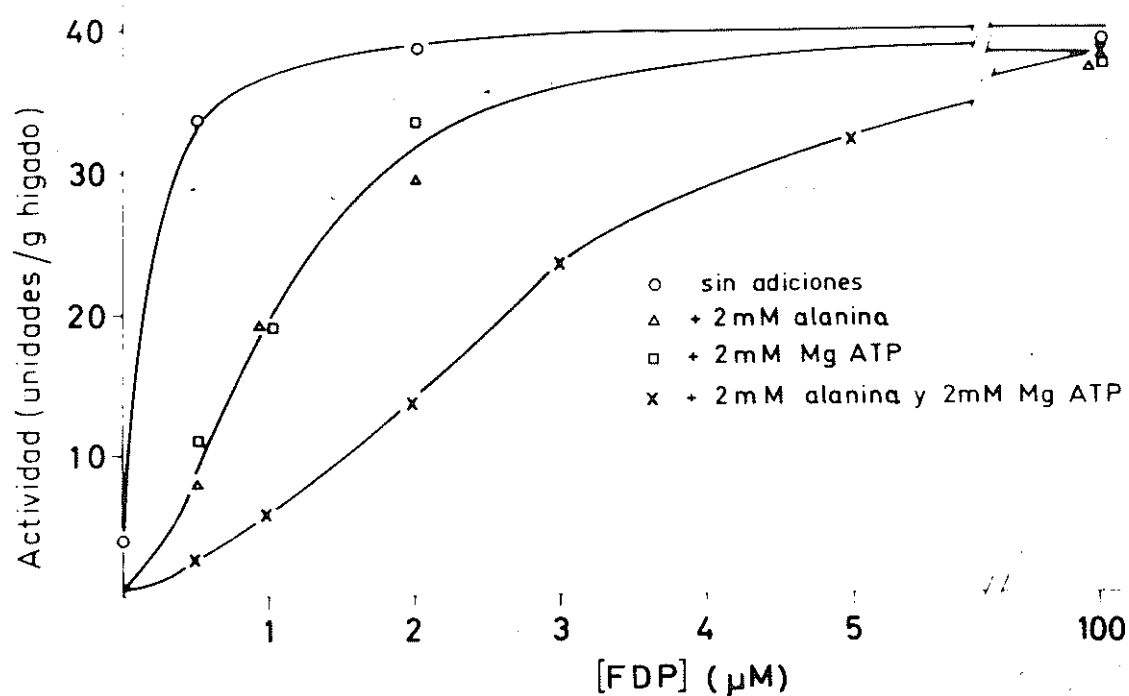


Fig. 43. Activación por FDP de la piruvato kinasa de hígado.  
Efecto de los inhibidores alostéricos. La piruvato ki-  
 nasa se ensayó a temperatura ambiente como se indi-  
 ca en material y métodos a una concentración de fos-  
 foenolpiruvato de 0,1 mM y a las concentraciones de  
 FDP que se indican en la figura. Los extractos se  
 preincubaban a 38° durante media hora.

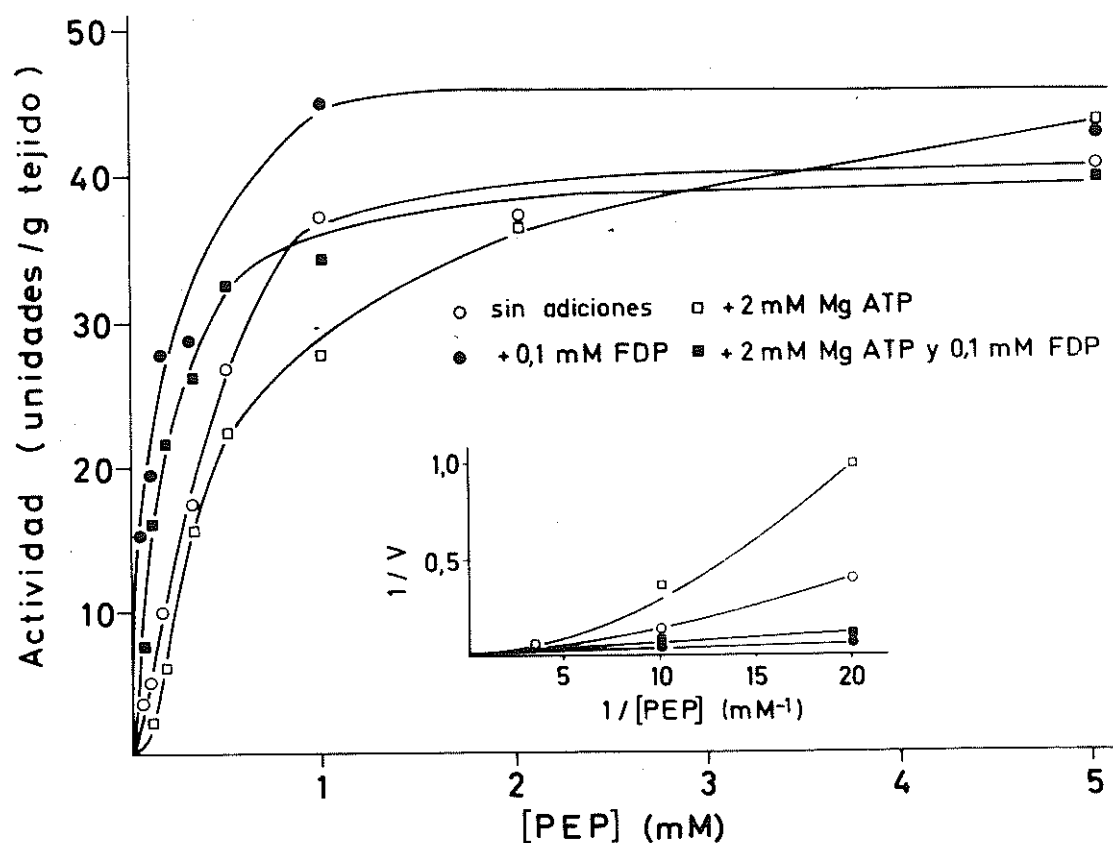


Fig. 44. Efecto del ATP y FDP sobre la piruvato kinasa de corteza renal. Los extractos se preincubaban a 38° durante media hora. La piruvato kinasa se ensayó a temperatura ambiente como se indica en material y métodos.

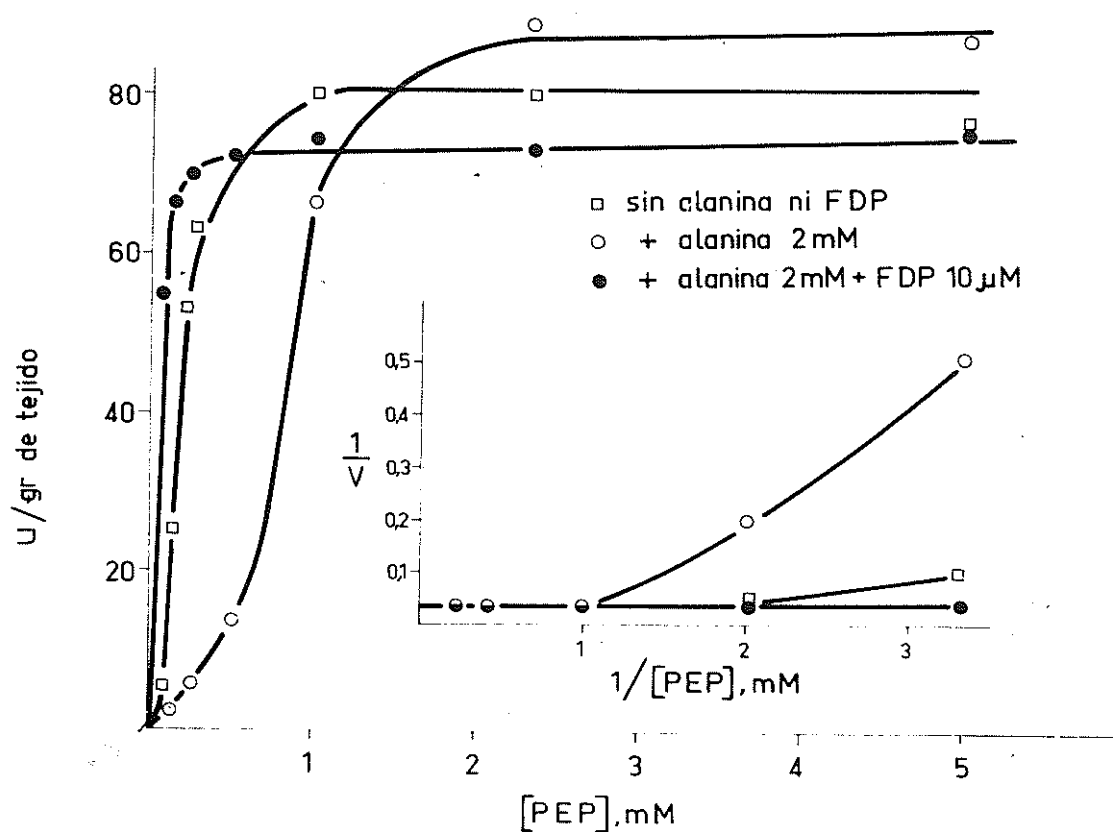


Fig. 45. Efecto de la alanina y FDP sobre la piruvato kinasa de riñón. Las condiciones son las mismas que en la figura 44, excepto que los extractos son de riñón total.



#### IV. DISCUSSION

Como se mencionó en la introducción, el objeto de este trabajo consistía en profundizar en los problemas planteados en nuestro intento de comprender el funcionamiento integrado de una vía metabólica tan compleja y fundamental para los organismos superiores como es la gluconeogénesis y su relación con la vía antagónica, la glicólisis. Estas dos vías se encuentran tan interrelacionadas que la célula hepática tiene que haber diferenciado algunos mecanismos específicos que las regulen coordinadamente. En ese sentido discutiremos los resultados de nuestra investigación insistiendo especialmente en aquellos puntos que no aparecen totalmente claros o en los que nuestro conocimiento es insuficiente. Digamos que no es sólo suficiente elaborar un modelo semicuantitativo de cómo la gluconeogénesis o la glicólisis pueden estar produciéndose en un momento dado sino que una de las pruebas de la utilidad de un modelo como éste la encontraremos en que sea capaz de explicar cómo en un momento determinado se realiza la transición de gluconeogénesis a glicólisis y viceversa, es decir, el paso de una situación metabólica en el que el flujo neto va de precursores de fosfoenolpiruvato  $\longrightarrow$  glucosa a otra en que el flujo se invierte marchando desde glucosa  $\longrightarrow$  piruvato (y grasas o ciclo de Krebs).

Las encrucijadas metabólicas del oxalacetato y del  
fosfoenolpiruvato

En un primer paso en el estudio planteado en la encrucijada del fosfoenolpiruvato y oxalacetato volvimos a estudiar con más profundidad el problema de la localización celular de los enzimas relacionados con ellas. Si desde los trabajos de Utter (160, 161) se suponía que era la acción secuencial de los enzimas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa, la que conseguía revertir la irreversibilidad fisiológica de la piruvato kinasa (14), su localización en distintos compartimientos en el hígado de rata (164), especialmente la de la piruvato carboxilasa en las mitocondrias planteaba una serie de problemas entre los que cabe destacar: a) el de la salida del oxalacetato de la mitocondria, b) el de la posible competición de otros enzimas por ese oxalacetato a lo largo de este transporte de modo que no sería suficiente encontrar un mecanismo de activación a nivel de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa para explicar su utilización preferente del oxalacetato formado por la piruvato carboxilasa, sino que también serían necesarios mecanismos de inhibición a nivel de los posibles enzimas competidores. Por ello, los resultados de Wagle (163) y Seubert (59) señalando la existencia de una piruvato carboxilasa citoplasmática parecían importantes en el caso de ser confirmados para plantear a modo de hipótesis de trabajo modelos alternativos que pudiesen explicar el funcionamiento selectivo de unas vías en detrimento de otras. Por otro lado hay que indicar que los resultados de Seubert no dejaban de plantear otros problemas, como por ejemplo el origen del acetil-CoA necesario para la activación de la supuesta piruvato

carboxilasa citoplasmática. Este compuesto, activador alostérico necesario (160), se produce en el interior de la mitocondria de acuerdo con nuestra concepción actual y era un requerimiento importante porque si los resultados de Seubert hablaban de suficiente piruvato carboxilasa citoplasmática para asegurar el flujo gluconeogénico, esto era en términos de actividades medidas en condiciones óptimas de sustratos y activador.

Sin embargo, como se ha visto en nuestra sección de resultados, todos nuestros esfuerzos para reproducir los hallazgos de Seubert fueron infructuosos y tras la puesta a punto de un método de fraccionamiento submitocondrial nuestra identificación (83a) de la piruvato carboxilasa como enzima soluble de la matriz mitocondrial dejaba en nuestra opinión zanjada completamente la cuestión, lo que quedó demostrado por la aparición de unos resultados semejantes obtenidos independientemente por el grupo de Wieland (12). La evolución en el punto de vista del propio Seubert al respecto es claramente indicativo de lo fundado de nuestros hallazgos. En una comunicación (166) a la 9ª conferencia de la Sociedad de Química Biológica alemana (Göttingen, 1970) intenta reinterpretar sus resultados como indicativos de una localización de la piruvato carboxilasa en un compartimiento de la mitocondria distinto que la glutámico deshidrogenasa, lo que no apoyan nuestros resultados. Otros resultados semejantes a los de Seubert con piruvato carboxilasa de tejido adiposo (115) indicativos de una porción citoplasmática del enzima podrían deberse también al escape del mismo de las mitocondrias rotas durante el proceso de homogenización, como por otro lado confirman resultados recientemente aparecidos (85) en donde estudian la localización de una amplia serie de enzimas en el tejido

adiposo de rata y efectivamente la piruvato carboxilasa aparece exclusivamente localizada en la fracción particulada. Algo semejante podría ocurrir con los resultados de doble localización de la piruvato carboxilasa de glándula mamaria (51). Los resultados inmunológicos del grupo de Ballard (7a) al no encontrar diferencias entre el enzima obtenido de la fracción soluble y particulada de distintos tejidos de la rata apoyan nuestra conclusión de que el enzima está exclusivamente localizado en las mitocondrias. Quedaría pues sólo la célula de levadura como poseedora de una piruvato carboxilasa citoplasmática. Su regulación (156), marcadamente distinta de la de mamíferos, estaría pues quizá ligada a su distinta localización.

Por otro lado ni los estudios iniciales de Utter (68) ni los últimos del grupo de Wieland (12) aclaraban el origen del resto de la piruvato carboxilasa particulada. Utter encontraba una fracción considerable de enzima en la fracción nuclear y Wieland al utilizar el método de extracción diferencial de Pette (47) sólo puede decir que el enzima no es soluble pero no a qué clase de partículas está asociado. Los resultados que presentamos aquí señalan claramente que en el hígado de rata la totalidad, o al menos la gran mayoría de la piruvato carboxilasa se encuentra asociada a las mitocondrias.

Aunque la localización de la piruvato carboxilasa era el problema más importante planteado, reexaminamos también el resto de los enzimas relacionados con las encrucijadas del oxalacetato y fosfoenolpiruvato. El grupo de Pette (103) y el de Wieland (12) habían identificado la citrato sintasa simplemente como particulada debido como ya hemos indicado al método empleado. Nuestros resultados indican que de modo mayoritario este



enzima se encuentra en la matriz mitocondrial de modo análogo a la piruvato carboxilasa. La succínico deshidrogenasa aparece también como exclusivamente mitocondrial (32) y asociada a la membrana interna (141). La glutámico oxalacético transaminasa y la malato deshidrogenasa aparecen con una doble localización, mitocondrial y citoplasmática, como ya se sabía (90, 134) y se ha identificado que la glutámico oxalacético transaminasa mitocondrial se encuentra localizada en la matriz mitocondrial como la malato deshidrogenasa (141). La fosfoenolpiruvato carboxikinasa de rata, la piruvato kinasa, la enolasa y la fructosa difosfatasa son enzimas citoplasmáticos. En el hígado de conejo la fosfoenolpiruvato carboxikinasa es mayoritariamente particulada y localizada en la matriz mitocondrial y el resto de los enzimas examinados se comportan de modo semejante a los de la rata.

Por tanto de todo ello se puede concluir que como se ilustra en la figura 46 en la célula hepática de rata existen dos encrucijadas del oxalacetato. Una está situada en la matriz mitocondrial y compuesta por las reacciones catalizadas por los siguientes enzimas que tienen el oxalacetato como sustrato: citrato sintasa, malato deshidrogenasa y glutámico oxalacético transaminasa. La piruvato carboxilasa, el enzima productor de oxalacetato también tiene esa localización y la succínico deshidrogenasa que tiene un sitio ligante para el oxalacetato, inhibidor de esta actividad, también es capaz presumiblemente de ligar el oxalacetato de la matriz mitocondrial aunque no exista una demostración directa de que efectivamente ese sitio ligante esté situado en la cara interna mitocondrial y no en la externa. La otra encrucijada del oxalacetato, citoplasmática, está compuesta por las reacciones catalizadas por los siguientes enzimas: malato deshidrogenasa, glutámico oxalacético transaminasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa.

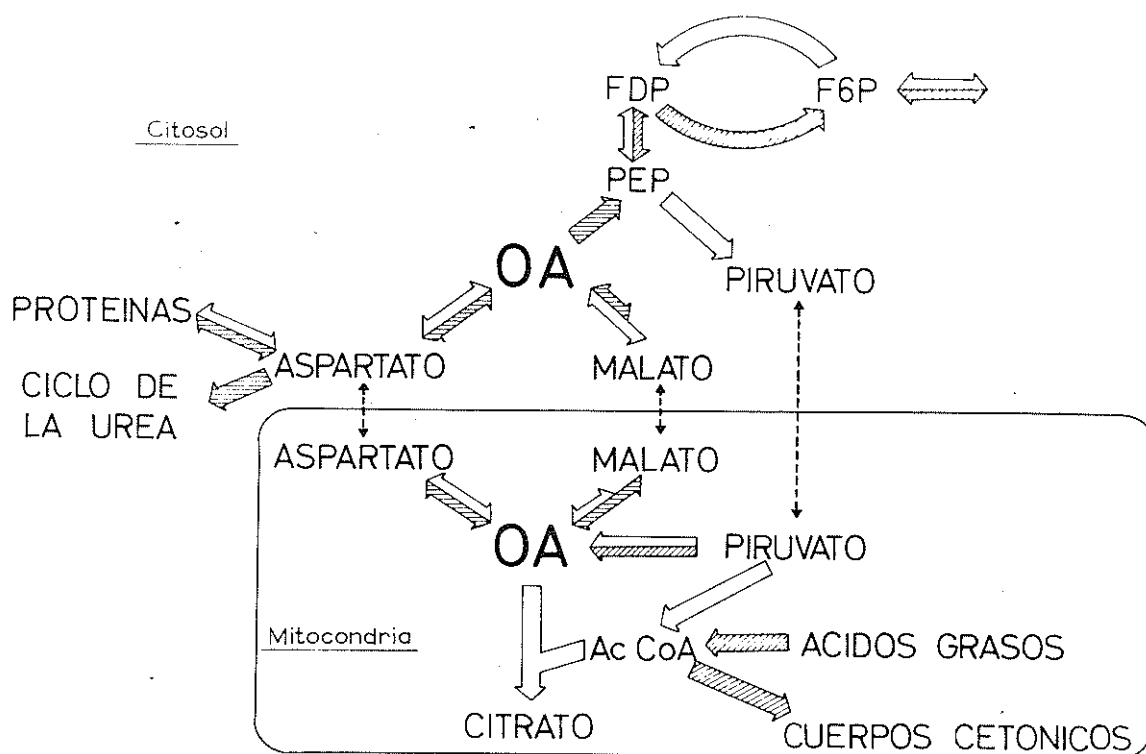


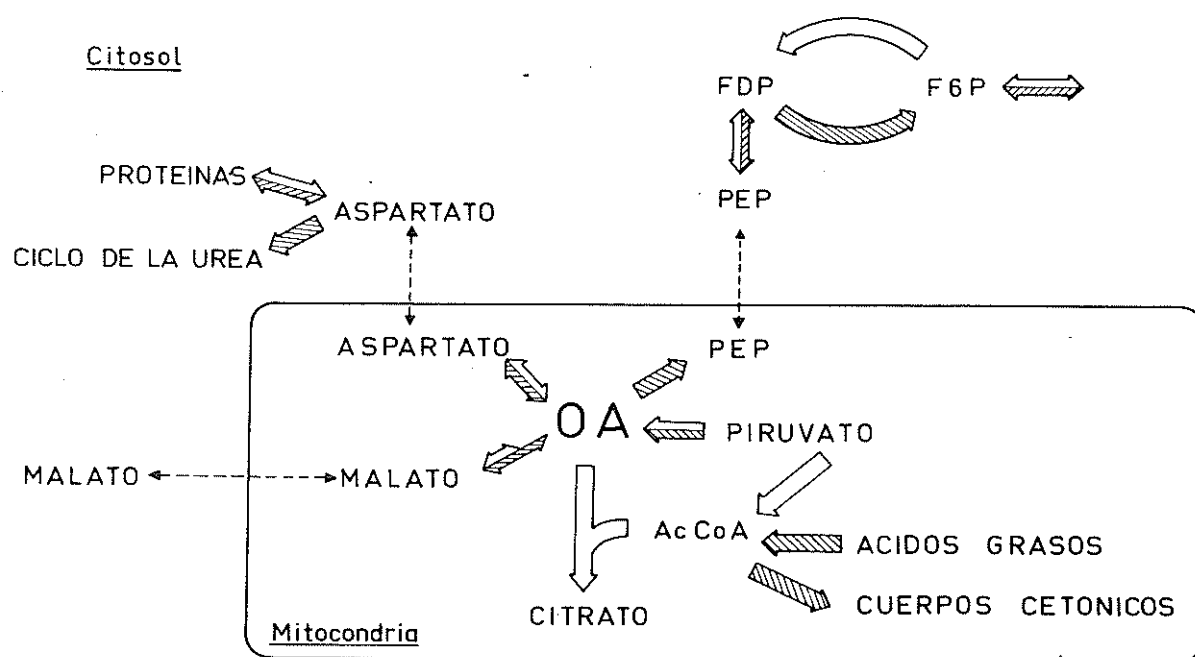
Fig. 46. Encrucijadas metabólicas del oxalacetato en hígado de rata.

La encrucijada del fosfoenolpiruvato es, en principio, exclusivamente citoplasmática y está formada por las reacciones catalizadas por la piruvato kinasa por una parte y la enolasa, el resto de enzimas reversibles de la parte central de la cadena glicolítica (fosfoglicerato mutasa, fosfoglicerato kinasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, triosafosfato isomerasa y aldolasa) y la fructosa difosfatasa como primer enzima irreversible en gluconeogénesis, por la otra parte.

En el hígado de conejo (figura 47) la modificación más importante es la distinta localización de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa que forma parte de la encrucijada del oxalacetato en la matriz mitocondrial.

#### Regulación de las encrucijadas del oxalacetato

Una vez resuelto, al menos dentro de las posibilidades de la metodología actual, el problema de la distribución de los distintos enzimas en los diferentes compartimientos celulares vamos a examinar los problemas planteados en la regulación del flujo gluconeogénico. Como se mencionó en la Introducción, los precursores gluconeogénicos más importantes son de tres tipos: a) aminoácidos gluconeogénicos, b) lactato y piruvato y c) glicerol y otros productos que entran a nivel de triosafosfato. Dejando a un lado el glicerol, los dos primeros grupos son precursores de glucosa que han de pasar por el nivel de oxalacetato y que debemos discutir aquí, así como sus posibles interrelaciones con otros procesos metabólicos.



**Fig. 47. Encruclizada mitocondrial del oxalacetato en hígado de conejo.**

Los aminoácidos gluconeogénicos pueden dividirse en varios grupos: 1. aquellos que por su transformación dan piruvato, tales como alanina (triptófano), cisteína y cistina, hidroxiprolina, serina (glicina); 2. glutamato (glutamina), arginina, ornitina, prolina e histidina que van a dar  $\alpha$ -cetoglutarato; 3. valina, isoleucina y treonina que darán succinato y 4. fenilalanina y tirosina que van a dar fumarato, y aspartato (asparragina) que va a dar oxalacetato o fumarato como comentaremos seguidamente.

La importancia de los aminoácidos como precursores de glucosa viene indicada por su número así como por la asociación de un proceso gluconeogénico como es el ayuno con un descenso considerable en el contenido proteico total de la fracción soluble del hígado (ver tablas 11 y 9). Sin embargo posiblemente factores de permeabilidad hacen que el aminoácido gluconeogénico más importante para el hígado sea la alanina (84) mientras que el riñón acepta otros como son el glutamato y no la alanina (13). Sin embargo, la formación de glucosa a partir del pool general de aminoácidos endógenos o del grupo de aminoácidos plasmáticos selectivamente permeables liga claramente el proceso de gluconeogénesis con el de ureogénesis. El proceso de ureogénesis permite la eliminación del nitrógeno en forma de urea que es excretada por el túbulo renal. Los dos nitrógenos de la urea provienen uno del carbamil fosfato sintetizado en el interior de la mitocondria a partir de iones amonio por reacción catalizada por la carbamillfosfato sintetasa



que por reacción con la ornitina va a dar citrullina. El otro nitrógeno proviene del aspartato que reaccionará en el citoplasma



celular con la citrulina dando arginínsuccinato, reacción catalizada por la arginínsuccínico sintetasa que posteriormente por la acción secuencial de la arginínsuccinasa y de la arginasa producirán urea, recuperándose la ornitina para cerrar el ciclo y quedando libre fumarato que puede volver vía fumarasa y malato deshidrogenasa a oxalacetato y aspartato. Por tanto a dos engranajes metabólicos (139) tiene que ir acoplado el proceso de producción de glucosa a partir de aminoácidos: uno, la producción de amonio libre bien a través de la glutámico deshidrogenasa mitocondrial que puede estar ligada a casi todos los aminoácidos a través de las respectivas transaminasas, bien en los casos concretos de ciertos aminoácidos a través de enzimas específicos de localización variada (prolina oxidasa, mitocondrial, histidasa citoplasmática, etc. Existe también una L-aminoácido oxidasa de significación muy discutible); y otro, la transaminación a aspartato en la que como paso intermedio se ha de pasar también por glutamato. El proceso de producción o liberación de amonio debe transcurrir preferencialmente en el interior de la mitocondria; al menos en sus fases finales puesto que tanto el enzima desaminante como la carbamillfosfato sintetasa son mitocondriales. El proceso de transaminación a aspartato puede transcurrir en el citosol puesto que la mayor parte de las transaminasas son abundantes en este compartimiento celular, en cuyo caso el flujo metabólico a través de la reacción catalizada por la transaminasa glutámico oxalacética citoplasmática marcharía en dirección oxalacetato  $\rightarrow$  aspartato, oxalacetato que se regeneraría a través de la malato deshidrogenasa. Por el contrario si la transaminación fuera intramitocondrial saldría del interior de la mitocondria en forma de aspartato sin que la glutámico oxalacético transaminasa citoplasmática llegara

a actuar (ver fig. 52). Más adelante volveremos sobre este problema. Ahora, antes de dejar este aspecto de la cuestión, mencionaremos que en el caso concreto de la serina el enzima desaminante es soluble y que produciría el amonio en ese compartimiento celular, pero además de ser éste uno solo de los 18 aminoácidos gluconeogénicos (82) en estos momentos el grupo de Lardy ha planteado, por experimentos realizados con inhibición a nivel de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa, que el camino metabólico de serina a glucosa quizás no pasa por piruvato sino que pudiera seguir una vía que lleva a 3-fosfoglicérico (80). Este problema permanece en la actualidad sin resolver y dentro de una discusión general del proceso de gluconeogénesis total parece de menor cuantía.

En el caso del hígado, pues, el conjunto más importante de precursores extraíbles del plasma van a dar piruvato (el propio piruvato, lactato, alanina, etc.). Después de producir piruvato bien intra o extramitocondrialmente la piruvato carboxilasa de la matriz mitocondrial va a formar oxalacetato cuyo destino ulterior vamos a discutir seguidamente. Más adelante discutiremos el problema de la entrada o salida de los diferentes sustratos y metabolitos en la mitocondria.

La piruvato carboxilasa aparece como el primer paso irreversible de la gluconeogénesis para estos sustratos que van a dar piruvato. Este enzima, como vimos (tabla 9), aumenta en gluconeogénesis. Como ya hemos indicado en la sección correspondiente de los resultados (2.A) estas determinaciones se han hecho en condiciones óptimas de valoración y este enzima depende en su actividad de la presencia de un activador alostérico, el acetyl-CoA.

Sin embargo las condiciones de gluconeogénesis coinciden con una condición general de movilización de los depósitos grasos y aumento de la lipólisis y oxidación de ácidos grasos en el hígado y otros tejidos (91). Los enzimas del proceso de oxidación de ácidos grasos son intramitocondriales (9) y tienen como producto final residuos de acetil-CoA y acetoacetil-CoA. Esto tiene como resultado el aumento de los niveles de acetil-CoA (144), y especialmente cuando se calculan en los distintos compartimientos celulares el aumento de los niveles del acetil-CoA intramitocondrial (175). Todo esto liga estrechamente, al menos temporalmente, la gluconeogénesis en organismos superiores con otro proceso importante, la cetogénesis. La producción de cuerpos cetónicos se puede racionalizar desde el punto de vista del metabolismo hepático, como una vía que impide la acumulación de acetil-CoA y que permite conservar un pool libre de CoA que asegure la continuidad en el proceso de oxidación de ácidos grasos que va a suministrar la energía necesaria para la célula hepática. Desde el punto de vista del metabolismo general va a suministrar unos compuestos como son los cuerpos cetónicos que cuando no sobrepasan límites tóxicos, son favorables a la homeostasis general pues son fácilmente utilizados para obtener energía por una serie de tejidos como el músculo cardíaco (177) e incluso por el cerebro (97).

Un problema que ha señalado Utter (158) con respecto a la regulación de la actividad de la piruvato carboxilasa por su activador acetil-CoA que parece que la constante de disociación ( $K_a$ ) de la piruvato carboxilasa es tan baja ( $2 \mu\text{M}$  a pH 7,8 (158)) para que el enzima esté totalmente activado en todos los valores de acetil-CoA mitocondrial, incluso cuando no hay gluconeogénesis.

Este problema ha conducido a Utter (158) a buscar posibles antiefectores que aumentasen la concentración a la que el acetil-CoA era efectivo. Sin embargo, otros factores a tener en cuenta son el gran número de enzimas mitocondriales que tienen al acetil-CoA como sustrato o efector (citrato sintasa, piruvato deshidrogenasa, piruvato carboxilasa, tiolasa,  $\beta$ -hidroximetilglutaril-CoA, carnitina aciltransferasas, etc.) así como su concentración considerable en la mitocondria podría repercutir en que una parte importante del acetil-CoA mitocondrial estuviese ligado a proteínas y que por tanto la concentración libre efectiva de este metabolito fuese bastante más pequeña que la total. Este hecho por otro lado haría más marcado el efecto de un aumento en la concentración total ya que repercutiría más en la concentración libre efectiva. Otro factor a tener en cuenta es que la normalidad de la piruvato carboxilasa en la mitocondria (ver la tabla 15) es mayor que su constante de afinidad por el acetil-CoA. Todo esto permite concluir que muy probablemente los niveles de acetil-CoA sí que controlan la actividad de la piruvato carboxilasa y que en condiciones de aumento de oxidación de ácidos grasos, como en la gluconeogénesis, su actividad aumenta.

Sin embargo, existen datos que impiden considerar a la piruvato carboxilasa como un enzima exclusivamente gluconeogénico. Su papel repleccionador de oxalacetato y, a su través, de otros intermediarios del ciclo de Krebs, es decir "anaplerótico" en el sentido de Kornberg no puede ser limitado a los microorganismos. Varios son los argumentos que apoyan esta consideración: a) el hecho de que la gluconeogénesis a partir de sustratos endógenos al menos no tenga por qué producirse obligatoriamente vía piruvato carboxilasa; una serie de aminoácidos como

ya hemos indicado entran a nivel de precursores de oxalacetato, b) la aparición en el desarrollo de la piruvato carboxilasa con anterioridad al nacimiento, primer momento gluconeogénico en contraste con la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (7), y c) el tercer argumento viene del abordaje nutricional presentado en la tabla 8. Como puede verse allí, una dieta rica en glucosa que reprime casi totalmente la fosfoenolpiruvato carboxikinasa produce un aumento en la piruvato carboxilasa. Por otro lado una dieta hiperproteica fuertemente gluconeogénica pero rica en precursores de los intermediarios del ciclo de Krebs produce junto a un fuerte aumento de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa, un descenso a la mitad de la piruvato carboxilasa. Podría ser que todos estos efectos sobre la concentración aparente del enzima estuvieran relacionados con la síntesis del holoenzima más bien que con la del apoenzima, de modo semejante a lo que Kornberg ha encontrado con el enzima de un bacilo termófilo en el que la formación del holoenzima a partir de la biotina y el apoenzima es activada por acetil-CoA e inhibida por aspartato (22).

#### La encrucijada mitocondrial.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que los enzimas mitocondriales que tienen oxalacetato como sustrato: citrato sintasa, malato deshidrogenasa y glutamato oxalacético transaminasa, están localizados en el mismo compartimiento mitocondrial que la piruvato carboxilasa. Vamos a discutir primero por separado las propiedades de estos enzimas para pasar luego a discutir el destino ulterior del oxalacetato formado.

La citrato sintasa es un enzima en el que se ha trabajado bastante tratando de encontrar propiedades de posible interés regulador. Atkinson trabajando con enzima de levadura (57) encontró



un efecto inhibitor por ATP que era competitivo con el acetil-CoA, el otro sustrato del enzima. El ADP y el AMP son ligeramente inhibidores pero cuando la actividad del enzima se computa frente al parámetro introducido por el propio Atkinson, la carga energética (5), se obtiene mayor inhibición conforme mayor carga energética existe. Este efecto se ha encontrado en otros tejidos animales (57) incluyendo el hígado de rata (65, 128) pero su efecto está limitado a ser competitivo con el acetil-CoA y no con el oxalacetato. Como en las condiciones gluconeogénicas el acetil-CoA aumenta, esto disminuye el posible papel efectivo que pueda tener este efecto sobre la regulación específicamente en gluconeogénesis del flujo de oxalacetato a citrato. Por otro lado, para la citrato sintasa de corazón de cerdo está descrito que los metales divalentes a concentraciones fisiológicas contrarrestan el efecto del ATP (74), aunque existen datos (34) de que la concentración de  $Mg^{++}$  libre intramitocondrial es bastante baja, pero eso puede ser precisamente función del  $Mg^{++}$  quelado por nucleótidos tales como ATP. Todo esto hace bastante problemático el interés de este efecto en la regulación de la citrato sintasa en relación a su posible competición por el oxalacetato formado en gluconeogénesis.

En ese sentido el efecto descrito aquí por los nucleótidos DPNH y TPNH (figuras 15 y 16) especialmente este último cuya concentración en la mitocondria (tabla 13) es del orden de 3 mM y que la inhibición es competitiva con el oxalacetato podría tener un cierto interés en el control del ciclo de Krebs. Esta interpretación estaría apoyada por el hecho de las grandes variaciones en el nivel de reducción del TPN con los diferentes tratamientos de las mitocondrias (90 - 2% (92)).

TABLA 13

Concentraciones de los diferentes piridín nucleótidos en el citoplasma y mitocondria del hígado de rata

		<u>Citoplasma</u>	<u>Mitocondria</u>
Concentración			
medida	DPN (mM)	0,5	1,8
	DPNH (mM)	0,07	0,7
	DPN/DPNH	7	2
calculada	DPN/DPNH	725	7
medida	TPN (mM)	0,035	0,1
	TPNH (mM)	0,12	3
	TPN/TPNH	0,3	0,03
calculada	TPN/TPNH	0,014	12

Los valores medidos están tomados de Glock y McLean (45) después de haber sido recalculados para expresarlos en forma milimolar usando las mismas suposiciones que hemos utilizado para calcular las concentraciones de los enzimas en las tablas siguientes 15 y 16. Las relaciones calculadas están tomadas de Williamson y colab. (173) y de Krebs y Veech (77).

La cinética de la malíco deshidrogenasa que se puede ver en las figuras 19 y 20 es compatible con un mecanismo ordenado de unión de los sustratos al enzima, típico de las deshidrogenasas (82) aunque no se puede descartar sin realizar estudios por inhibición por producto un mecanismo "random" en el que la unión del segundo sustrato no afectara a las constantes de unión del primero. En cuanto a las constantes cinéticas nuestros datos presentan el interés de estar obtenidos a pH fisiológicos y con enzima proveniente de mitocondrias de hígado (ver la tabla 14). Puede verse en esa tabla la reducción en valores de las constantes cinéticas especialmente en lo que se refiere a las de la dirección oxalacetato  $\longrightarrow$  malato.

La cinética de la glutámico oxalacético transaminasa mitocondrial que se puede ver en las figuras 21-24 corresponde a una cinética de paralelas compatible con un mecanismo ping-pong bi bi de adición de los sustratos al enzima, típico de las transaminasas (82). A la concentración fisiológica de glutamato, alrededor de 5 mM, la  $K_m$  del oxalacetato es del orden de 30  $\mu$ M, mientras que a concentración de oxalacetato de 25  $\mu$ M la  $K_m$  del glutamato es 1 mM. Como consecuencia de su mecanismo, a concentraciones inferiores de oxalacetato será aún más baja la  $K_m$  del glutamato.

Pasemos ahora a considerar el destino ulterior del oxalacetato formado por la piruvato carboxilasa en la matriz mitocondrial. Una solución podría ser que ese oxalacetato saliese directamente al exterior y allí fuera procesado seguidamente por la fosfoenolpiruvato carboxikinasa. Esto nos vuelve a llevar al problema de la permeabilidad mitocondrial, problema que nos parece necesario discutir brevemente aquí.

TABLA 14

Malato deshidrogenasa mitocondrial. Constantes de Michaelis

Origen	Corazón de buey	Riñón de buey	Hígado de rata
pH medida	9	7,4	7,0
tampón	EDTA 0,1 M	fosfato 0,1 M	fosfato 30 mM
$K_m$ (mM)			
Malato	1	0,5	0,25 (0,07)
DPN	0,5	0,25	0,2 (0,05)
Oxalacetato	0,04	0,016	0,002
DPNH	0,025	0,009	0,0014

Los datos de corazón de buey son del trabajo de Grimm y Doherty (50), los de riñón de buey de Doupourque y Kun (30) y los de hígado de rata de este trabajo. Los datos entre paréntesis están obtenidos con acell DPN como nucleóido oxidado.

Como dice Harris (54) "the mitochondrion behaves like a selective and perhaps compartmented ion exchanger. Most substrates enter fresh liver mitochondria without a co-factor requirement being obvious because endogeneous anions are present to exchange against new anions. Only after depletion of liver mitochondria do their special exchange requirements become manifest; particles derived from some other sources can already be so poor in the key anions (phosphate, malate) that no prior treatment is required. Liver mitochondria take up phosphate, acetate, pyruvate, hydroxybutyrate and glutamate provided that energy has not been withdrawn too long before the test is made. Dicarboxylates exchange against phosphate, or amongst themselves, or against oxoglutarate or tricarboxylate. A chain of mutually contingent movements can be drawn up dependent upon the presence of phosphate".

Sin embargo estamos muy lejos de conocer los requerimientos y necesidades de todos los posibles intermediarios de estos procesos. Parece claro que la mitocondria se comporta como un electroosmómetro que ha de conservar un equilibrio osmótico y eléctrico, que liga entre sí las entradas y salidas de los diferentes aniones y cationes. Junto a este requerimiento general existen los más específicos de los transportadores y translocadores que aparentemente existen en la membrana interna mitocondrial y que en el sentir de Klingenberg (69) serían la cara funcional de lo que se conoce con el nombre más bien amorfo de "proteína estructural". Es cierto que el método de "swelling" permite suponer que algunos metabolitos son capaces de entrar sin que sea necesario que se produzca ningún intercambio para mantener la osmoticidad de la mitocondria, pero posiblemente



este proceso sea más limitado in vivo que in vitro. Todo ello crea un entresíjo de interrelaciones y posibles competiciones muy difícil de evaluar en el momento presente en que para mayor complicación nuestro conocimiento sobre las permeabilidades de todos los compuestos es aún claramente incompleto. Por ejemplo no se sabe nada de los requerimientos de los intermediarios del ciclo de la urea, citrulina, ornitina, etc. para entrar o salir de las mitocondrias o en otro orden de cosas el que Chappell y Robinson (26) digan que el bicarbonato no es capaz de penetrar en la mitocondria (y por extensión lógica de salir) plantea una serie de problemas como son los de la salida del  $\text{CO}_2$  proveniente de las oxidaciones decarboxilativas, problemas de un interés evidente. Vamos pues a resumir brevemente lo que se sabe sobre permeabilidad mitocondrial (26, 69, 87). No se ha podido demostrar permeabilidad para el  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ , fumarato, maleato, metilmaleato, metilfumarato, dihidroximalato, n-butilmalonato, 2-fenilsuccinato, transaconitato y propano 1,2,3 tricarbóxilato, aunque en este último caso los resultados de Robinson y colab. con mitocondrias de tejido adiposo parecen indicar que sí permea (117). En este sentido es importante tener en cuenta que los resultados negativos están más abiertos a corrección futura que los positivos, pues pueden significar solamente un requerimiento especial que no se tuvo en cuenta al diseñar el experimento. Las sustancias que penetran son: a) aquellas para las que no ha sido posible encontrar transportador: piruvato, hidroxibutirato, acetoacetato, acetato, ac. grasos y aniones no polarizables, como la azida y el  $\text{SCN}^-$  y b) aquellas para las que hay pruebas de transportador: 1º el sistema de adenín nucleótidos, con transnucleotidasa inhibible por atractilósido y ácido bongkreico, 2º el

sistema del malato y succinato que intercambian con fosfato (que junto al arsenato y otros aniones como el formiato y acetato es capaz de penetrar directamente sin ningún requerimiento adicional (26)), 3º otros ácidos dicarboxílicos, como el  $\alpha$ -cetoglutarato que intercambian con malato, 4º el sistema de los ácidos tricarboxílicos como son citrato, isocitrato y cis-aconitato que intercambian con malato (26), 5º el glutamato que permea aparentemente sin requerimientos y 6º el del aspartato que intercambia con glutamato (6).

La concentración de oxalacetato intramitocondrial es otro de los problemas centrales en la consideración de la encrucijada mitocondrial del oxalacetato. Si aceptamos los cálculos de Krebs (173) para llegar a dar un valor, su concentración sería muy baja,  $0.1 \mu\text{M}$  para una concentración intramitocondrial de malato de  $0.5 \text{ mM}$ , ó  $0.7 \mu\text{M}$  si el malato es  $2.5 \text{ mM}$ . Estos cálculos están obtenidos suponiendo que la malato deshidrogenasa está en equilibrio, suposición que no parece improbable debido a la alta concentración de este enzima en la mitocondria (ver tabla 7) y a sus relativamente buenas afinidades por todos sus sustratos (tabla 14).

La primera pregunta es ¿no podría salir de la mitocondria el oxalacetato como tal? Haslam y Krebs (56) y Haslam y Griffiths (55) han examinado directamente el problema. La entrada del oxalacetato que ellos detectan se hace a través del transportador del malato (69) y tiene una  $K_m$   $40 \mu\text{M}$  muchísimo más alta que los valores calculados para las concentraciones intramitocondriales del oxalacetato. Ambos hechos tomados en consideración prácticamente excluyen la posibilidad de una salida directa del oxalacetato del interior de la mitocondria. Este hecho llevó a

Lardy (79) a postular la salida del oxalacetato mitocondrial en forma de aspartato producido por transaminación o de malato obtenido por deshidrogenación. Nuestros resultados sobre la exclusiva localización intramitocondrial de la piruvato carboxilasa apoyan fuertemente las conclusiones de Lardy.

A pesar de los aportes mayores de oxalacetato y acetil-CoA en condiciones gluconeogénicas el flujo a través del ciclo de Krebs está disminuido (91, 170). Esto se explica desde un punto de vista teleológico porque el DPNH necesario para la obtención de ATP a través de las cadenas oxidativa y fosforilativa proviene en estas condiciones en buena parte de la oxidación de ácidos grasos. La disminución en la citrato liasa con el ayuno (1, 133) e investigaciones de Lardy (164) y de Felicioli (40) parecen excluir al citrato como intermediario de la salida del oxalacetato de la mitocondria. Los valores de la tabla 7 y de las figuras 13, 19 y 22 expresados en forma de capacidades máximas relativas de consumo de oxalacetato para cada enzima ( $V_{max}/K_m$ ) son: 150 para la málico deshidrogenasa, 1 para la glutámico oxalacético transaminasa y 5 para la citrato sintasa. Si tuviéramos que prestar sólo atención a estas cifras, claramente la málico deshidrogenasa sería la que debería actuar preferentemente sobre el oxalacetato formado por la piruvato carboxilasa. Sin embargo, in vivo estas diferencias probablemente se concretan en que la probabilidad de que la málico deshidrogenasa esté en equilibrio o cerca del equilibrio es muy grande y que por tanto la concentración de oxalacetato debe de ser muy baja, lo que por sí solo no puede explicar la disminución en el flujo a nivel de la citrato sintasa si simultáneamente la glutámico oxalacético transaminasa debe de funcionar más. La situación se convierte

en conflictiva a menos que exista un mecanismo de control a nivel de la citrato sintasa en gluconeogénesis, que no debe ser la inhibición por adenín nucleótidos, por ser sólo competitiva con el acetyl-CoA (65), pero que podría ser la inhibición por TPNH.

Sin embargo, el problema puede ser mucho más complicado, pues un sencillo cálculo (140) demuestra que la concentración de una sola molécula en el interior de una mitocondria es del orden de  $0.1 \mu\text{M}$ . Es decir, la concentración del oxalacetato para que la málico deshidrogenasa esté en equilibrio equivale a unas pocas moléculas en el interior de la mitocondria. Por otra parte si calculamos las molaridades de los enzimas de la encruclijada del oxalacetato en la mitocondria (tabla 15) veremos que todos ellos exceden con mucho a la concentración de su sustrato (o efector), haciendo todavía más complicada la situación. Realmente, si estos enzimas poseyesen alguna clase de organización a nivel molecular, podría ser éste el factor fundamental que gobernase la distribución del oxalacetato por las distintas vías metabólicas según su procedencia, convirtiendo en poco importante la posible competición de los demás enzimas que se encontrarían físicamente alejados de los lugares de producción y utilización del oxalacetato.

#### La encruclijada citoplasmática

En el citoplasma del hígado de rata los enzimas que pueden utilizar el oxalacetato son tres: malato deshidrogenasa, glutámico oxalacético transaminasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa. Examinaremos brevemente sus propiedades y en segundo lugar describiremos el posible funcionamiento global de la encruclijada.

TABLA 15

Concentración de los sitios ligantes para el oxalacetato en las mitocondrias de hígado de rata

Enzima	Actividad	Actividad molecular <sup>b</sup>	Molaridad <sup>c</sup>	Subunidades	Normalidad	Km ó Ki
	(U/gr tejido) <sup>a</sup>		( $\mu$ M)		( $\mu$ N)	( $\mu$ M)
Citrato sintasa	10	$7 \times 10^3$	35	(2?)	70?	1-5 <sup>a</sup>
Glutámico oxalacético transaminasa	30	$15 \times 10^3$ <sup>d</sup>	50	2 <sup>d</sup>	100	30 <sup>a</sup>
Malato deshidrogenasa	160	$57 \times 10^3$	70	2 <sup>e</sup>	140	2 <sup>a</sup>
Succínico deshidrogenasa	15	$11 \times 10^3$	25	(5?)	125?	1 <sup>f</sup>
Piruvato carboxilasa	10	$21 \times 10^3$	10	4 <sup>c</sup>	40	50 <sup>b</sup>
				sitios ligantes =	400	

Los valores que aparecen con un interrogante están calculados con la suposición de que 40.000 es el peso molecular medio de las subunidades proteicas (140).

<sup>a</sup> Valores tomados de esta tesis. <sup>b</sup> Datos tomados de Berman (8). <sup>c</sup> Las molaridades de los enzimas y metabolitos intramitocondriales están calculadas suponiendo que las proteínas mitocondriales son como el 25% del total de las proteínas celulares y que en las mitocondrias 1 mg de proteína corresponde a 1  $\mu$ l de agua (129) y un contenido total de proteínas de 150 mg por gramo de tejido. <sup>d</sup> Este valor corresponde al enzima citoplasmático. Según Berman (8) los enzimas citoplasmáticos y mitocondriales tienen propiedades semejantes. <sup>e</sup> Datos de Pardee y Potter (100). <sup>f</sup> Datos de Mann y Vestling (83).

Como puede verse en la tabla 15 el paso a condiciones más fisiológicas de pH, parece tener también un considerable efecto en las constantes cinéticas de la malato deshidrogenasa citoplasmática. Globalmente las diferencias en  $K_m$  y respuestas al acetil DPN de las malato deshidrogenasas citoplasmática y mitocondrial son seguramente reflejo de las diferencias entre los dos enzimas (134). Con ser pequeñas las diferencias en afinidades por los diferentes sustratos sugerirían una mayor adaptación de la malato deshidrogenasa citoplasmática para actuar en la dirección malato  $\longrightarrow$  oxalacetato (más bajas  $K_m$  para el malato y DPN, frente a mayor para el oxalacetato), frente a una mayor bidireccionalidad en el caso de la mitocondrial.

La glutámico oxalacético transaminasa citoplasmática también demuestra una cinética de paralelas, tiene una  $K_m$  por el glutamato sensiblemente inferior a su concentración en la célula hepática y una  $K_m$  para el oxalacetato de 25 a 15  $\mu M$  en los límites fisiológicos de variación del glutamato. En general, por tanto, no presenta grandes diferencias en cuanto a su comportamiento cinético con respecto al isoenzima mitocondrial, extendiendo de este modo al hígado de rata resultados experimentalmente más completos de Henson y Cleland (60) con enzima de corazón de cerdo.

Si bien el enzima que presenta cambios adaptivos más grandes es la fosfoenolpiruvato carboxikinasa citoplasmática de hígado de rata (ver tabla 9) los estudios cinéticos detallados sobre este enzima son bastante escasos. Muy probablemente la causa está en la poca estabilidad del enzima que dificulta su purificación y la dificultad de su ensayo en condiciones adecuadas. Por el contrario con el enzima mitocondrial, más resistente, existen varios trabajos sobre sus propiedades cinéticas. Felicioli y cols. (41) con enzima



TABLA 16

Malato deshidrogenasa citoplasmática. Constantes de Michaelis

Origen	Corazón de buey	Riñón de buey	Hígado de rata
pH ensayo	9	7,4	7,0
tampón	EDTA 0,1 M	fosfato 0,1 M	fosfato 30 mM
$K_m$ (mM)			
Malato	0,5	0,5	0,05 (0,03)
DPN	0,2	0,3	0,05
Oxalacetato	0,05	0,02	0,004
DPNH	0,03	0,01	0,001

Los datos provienen de las mismas fuentes que los de la tabla 14.

mitocondrial de hígado de pollo encuentran una cinética compatible con un mecanismo ordenado pero con una  $K_m$  para el oxalacetato de 4 mM. El estudio del grupo de Lane (24, 25) sobre el enzima de mitocondria de corazón de cerdo obtiene una  $K_m$  para el oxalacetato de 0,1 mM. Holten y Nordlie (62) trabajando con hígado de cobaya obtienen una  $K_m$  para el oxalacetato de 1 mM para el enzima mitocondrial y 3 mM para el soluble. El grupo de Lardy (42) trabajando ya con hígado de rata encontró una  $K_m$  de 0,13 mM para el oxalacetato, determinada a pH 8. Los resultados obtenidos por nosotros con el enzima soluble de hígado de rata y a pH 7 son los siguientes: a) el enzima presenta cinética normal hiperbólica, b) no parecen existir diferencias marcadas en la cinética del enzima dependiendo del estado nutricional del animal, c) la  $K_m$  para el oxalacetato es del orden de 0,2 mM, d) la cinética a concentraciones variables del cosustrato es compatible con un mecanismo ordenado, e) junto al metal ligado al cosustrato, probablemente  $Mg^{++}$ , existe probablemente en el enzima un sitio ligante para un segundo metal divalente activador  $Mn^{++}$ ,  $Fe^{++}$  ó  $Co^{++}$ , como se deduce de los resultados de la tabla 10 y de la figura 34. Resultados semejantes habían sido obtenidos por el grupo de Lardy (42) sólo que los valores más bajos de  $Mn^{++}$  para activación máxima obtenidos por ellos probablemente dependían de la preincubación previa del enzima con  $Mn^{++}$ . En ambos casos, la determinación del efecto independiente de los metales del tipo del  $Mn^{++}$  y el orden de concentración en que son activos depende de la presencia simultánea de concentraciones un orden de magnitud mayor de  $Mg^{++}$  que actúe ligado al cosustrato; en su ausencia, los requerimientos del nucleótido enmascaran la activabilidad específica por el  $Mn^{++}$ .

Mientras la concentración intramitocondrial del oxalacetato plantea toda la serie de problemas discutidos anteriormente, la concentración citoplasmática puede considerarse aproximadamente equivalente a la total medida con las técnicas apropiadas (10). De esta forma una concentración de oxalacetato de 5 - 10  $\mu\text{M}$  es la que se encuentra en hígado de rata (174). Cuál es la razón principal de las diferencias entre el interior de las mitocondrias y el citoplasma? No reside en las propiedades distintas de los enzimas productores o eliminadores de oxalacetato, que son más bien escasas como se puede ver por los resultados presentados aquí, por tanto insuficientes para explicarlos. A nuestro juicio la razón de esta diferencia reside en los distintos valores de los cocientes DPNH/DPN existentes en la mitocondria y en el citoplasma (tabla 13). El que este cociente sea tan pequeño en el citoplasma explica que a través del equilibrio de la málico deshidrogenasa produzca una concentración relativamente alta de oxalacetato en el citoplasma. Como estos nucleótidos también están compartimentados y la pared mitocondrial es impermeable a los mismos, no parece necesario postular ninguna clase de consumo especial de energía para conseguir el paso del oxalacetato desde sus niveles bajos en la mitocondria a los relativamente altos del citosol como sugieren Haan y Oestreicher (52) y Rognstad y Katz (119). Por otro lado el factor de competición de los sitios ligantes de los diferentes enzimas por el oxalacetato citoplasmático, aún existiendo, no tiene el mismo grado de complejidad que en la encrucijada mitocondrial (tabla 17).

Expresados en la misma forma que los enzimas de la encrucijada mitocondrial, la actividad relativa máxima de los enzimas de la encrucijada citoplasmática ( $V_{\text{max}}/K_m$  ( $\mu\text{M}$ )) es: 70 para la

TABLA 17

Concentración de sitios ligantes para el oxalacetato en el citoplasma de hígado de rata

Enzima	Actividad <sup>a</sup>	Actividad molecular <sup>b,c</sup>	Molaridad	Subunidades	Normalidad	Km ó Ki
	(U/gr tejido)		( $\mu$ M)		( $\mu$ N)	( $\mu$ M)
Glutámico oxalacético transaminasa	10	$15 \times 10^3$	1,6	2 <sup>b</sup>	3	20 <sup>a</sup>
Malato deshidrogenasa	325	$11 \times 10^3$	30	(2 <sup>d?</sup> )	60?	4 <sup>a</sup>
Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	10	$7 \times 10^2$	15	(2?)	30?	200 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Valores de esta tesis. <sup>b</sup> Datos de Barman (8). <sup>c</sup> Los cálculos se realizan tomando como primera aproximación los  $\mu$ moles por gramo de hígado en mM, sin correcciones para el agua intersticial y no citoplasmática. <sup>d</sup> Datos de Mann y Vestling (65). La malato deshidrogenasa citoplasmática tiene dos subunidades.

malato deshidrogenasa, 1 para la glutámico oxalacético transaminasa y 0,1 para la fosfoenolpiruvato carboxikinasa. Sin embargo aquí la situación varía con respecto a la encrucijada citoplasmática puesto que no existe ningún enzima específico productor del oxalacetato tal como la piruvato carboxilasa y tanto la malato deshidrogenasa como la glutámico transaminasa (alternativa o simultáneamente) son los enzimas encargados de producir oxalacetato como seguidamente comentaremos con mayor detalle. La segunda conclusión es que tanto la malato deshidrogenasa como la glutámico oxalacético transaminasa están probablemente muy cercanas a equilibrio y estarían dispuestas a rápidamente reponer el oxalacetato drenado por la fosfoenolpiruvato carboxikinasa.

Este permanece siendo el mayor problema a nivel de esta encrucijada, porque la capacidad máxima de este enzima en condiciones de gluconeogénesis, suponiendo una concentración de oxalacetato de  $10\text{ }\mu\text{M}$  apenas llega a  $0,5\text{ }\mu\text{moles}$  de fosfoenolpiruvato/min/gr de hígado frente a la capacidad de este órgano de producir del orden de  $1\text{ }\mu\text{mol}$  de glucosa/min/gr de hígado (37). Sin embargo la discrepancia tampoco es tan marcada, teniendo en cuenta la posibilidad de un aporte suplementario de intermediarios provenientes del glicerol por ejemplo a nivel de triosas fosfatos. La negatividad de nuestros repetidos esfuerzos de encontrar un posible activador del enzima parece indicar su inexistencia, reforzada por el hecho de la normalidad en la cinética frente al oxalacetato. Por tanto podría ser que efectivamente el único control de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa fuese el mediado por su cambio en actividad, que sería ya totalmente efectivo si la  $K_m$  in vivo del enzima (concentración, ambiente, etc.) fuese más baja que la medida in vitro. Por otro lado, es cierto que

la regulación de la producción de fosfoenolpiruvato no necesita ser excesivamente estricta puesto que el control de la encruclijada del fosfoenolpiruvato que vamos a considerar a continuación puede en buena parte modular la producción de fosfoenolpiruvato, eliminando a través de la piruvato kinasa todo exceso sobre las necesidades de ese intermediario.

### Regulación de la encruclijada del fosfoenolpiruvato

La encruclijada metabólica del fosfoenolpiruvato está limitada en principio a los tejidos poseedores de concentraciones significativas de fosfoenolpiruvato carboxikinasa, como son los órganos gluconeogénicos hígado y riñón. En glicólisis el flujo metabólico a nivel del fosfoenolpiruvato no encuentra ninguna encruclijada teniendo en cuenta la irreversibilidad fisiológica de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (la vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano no es cuantitativamente importante en comparación con la glicólisis y la gluconeogénesis, para que sea necesario considerarla en esta discusión). En gluconeogénesis por el contrario el fosfoenolpiruvato formado por la fosfoenolpiruvato carboxikinasa tiene la posibilidad teórica de marchar hacia glucosa siempre que la piruvato kinasa no lo vuelva a reciclar a piruvato. La serie de enzimas que se supone catalizan el paso del fosfoenolpiruvato a glucosa es el paquete central reversible de enzimas glicolíticos hasta la fructosa difosfato. El paso de fructosa difosfato a fructosa 6-fosfato en gluconeogénesis está catalizado por la fructosa difosfatasa, que es por tanto el enzima irreversible siguiente en gluconeogénesis.



El número importante de reacciones reversibles que separan la fructosa difosfato del fosfoenolpiruvato hace bastante inverosímil que la simple activación de la fructosa difosfatasa sea suficiente para impedir la competición por la piruvato kinasa. El control de este enzima podía producirse a nivel exclusivamente de su concentración. Aunque como hemos visto existe una disminución en la actividad de la piruvato kinasa cuando el hígado se encuentra sometido a una situación gluconeogénica como es el ayuno ésta es insuficiente para asegurar el control de la encrucijada.

El comportamiento alostérico del enzima procedente de hígado y de riñón descrito en este trabajo claramente se ha diferenciado para hacer frente a este problema. El efecto desensibilizador del frío es la causa de la dificultad encontrada en estudios anteriores para reproducir (146) el comportamiento alostérico en extractos crudos y además ha permitido confirmar y descartar otros posibles efectos. La inhibición por alanina y ATP es en este caso típicamente alostérica, pues además de su carácter competitivo con el sustrato fosfoenolpiruvato aumentando la sigmoicidad de su cinética, y no con el ADP a cocientes ATP/ADP incapaces de inhibición significativa por competición a nivel del sitio sustrato nucleótido, ese efecto de desensibilización en frío parece indicar claramente la existencia de un mecanismo cooperativo. La cinética sigmoide del sustrato fosfoenolpiruvato indica la existencia de un efecto homotrópico, típico también del comportamiento alostérico (89), y que también se pierde por el tratamiento a baja temperatura. Los resultados obtenidos a diferentes temperaturas (figura 39 y tabla 12) parecen excluir que se trate de un proceso función progresiva de la temperatura como parece ser el caso con otros enzimas alostéricos (fructosa

difosfatasa (150) y fosforilasa b (67)) sino más bien un efecto brusco de desensibilización por debajo de una temperatura dada. La inhibición por ATP de la piruvato kinasa de hígado es claramente diferenciable de las inhibiciones cinéticas por producto descritas en el caso de otras piruvato kinasas (15, 53, 116). La regulación de la piruvato kinasa se completa por el efecto activador "feedforward" por fructosa difosfato que transforma en hiperbólica la cinética de la piruvato kinasa, contrarrestando el efecto inhibidor del ATP y de la alanina.

La figura 48 resume cualitativamente la regulación de la piruvato kinasa hepática. Este control aparentemente tan complicado tiene posiblemente su razón de ser en el carácter intertisular con respecto al metabolismo general del organismo que posee la gluconeogénesis, que convierte en insuficiente un simple mecanismo de inhibición feedback o activación feedforward para controlar este proceso, como puede bastar para el caso de los microorganismos en donde el mantenimiento de la homeostasis celular es el único parámetro biológico importante. En el caso de los tejidos de los organismos superiores, particularmente de aquéllos más especializados en el servicio de las necesidades generales, el mantenimiento de la homeostasis general puede ser más importante que el de la propia homeostasis celular. En ese sentido, el mantenimiento de una serie de controles generales, tales como la inhibición por ATP de la fosfofructokinasa o el acoplamiento de la regulación de la piruvato kinasa de los órganos gluconeogénicos a la inhibición por ATP y alanina puede ser una forma de impedir que el mantenimiento de la homeostasis general llegue a dominar tan absolutamente sobre la celular, que siga llevando la batuta del metabolismo celular cuando por cualquier razón

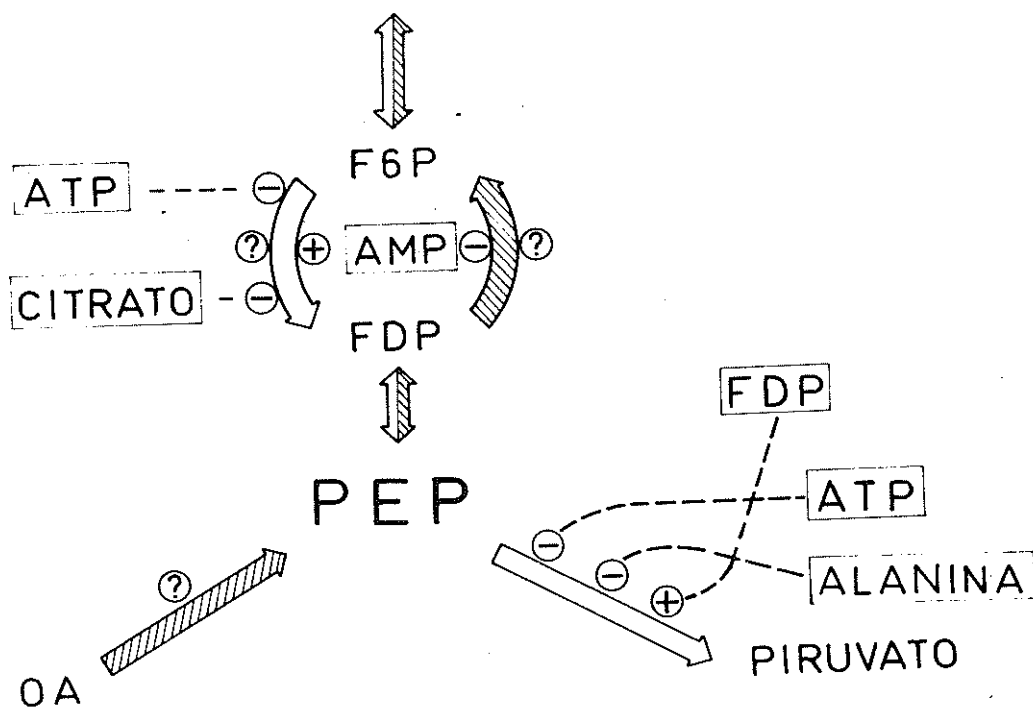


Fig. 48. Regulación de la encruclizada del fosfoenolpiruvato en hígado de rata.  $\oplus$  activación,  $\ominus$  inhibición,  $\textcircled{?}$  presunto efecto regulador desconocido. Los efectores aparecen dentro de un recuadro.

hubiese un deterioro grave de la situación metabólica de la propia célula hepática. Toda caída aguda en los niveles de ATP (o de alanina) produciría la activación de los enzimas glicolíticos que superarían a los gluconeogénicos.

Si pasamos a la valoración cuantitativa del comportamiento de la piruvato kinasa en relación con las concentraciones fisiológicas de sus diferentes efectores, resulta que mientras de la figura 42 puede deducirse que a concentración fisiológica, el ATP y la alanina inhiben fuertemente la actividad piruvato kinásica de los extractos, la activación por fructosa difosfato se realiza a concentraciones muy por debajo de las fisiológicas; así  $0,5 \mu\text{M}$  fructosa difosfato basta para activar completamente la piruvato kinasa, mientras que las concentraciones normalmente medidas de este metabolito en hígado son del orden de  $10 - 20 \mu\text{M}$  (38). Los resultados de la figura 43 muestran que en presencia de alanina y ATP aumenta la concentración a la que la fructosa difosfato es plenamente activa a  $3 \mu\text{M}$  en presencia de ATP o alanina, y a unos  $8 \mu\text{M}$  en presencia de ambos efectores. Además la respuesta de la actividad piruvato kinasa a la fructosa difosfato se vuelve claramente sigmoide. La posible discrepancia disminuye aún más si se tiene en cuenta la molaridad de sitios ligantes para la fructosa difosfato en el citoplasma del hígado (tabla 18). Especialmente la normalidad de la aldolasa es claramente superior a la molaridad de la fructosa difosfato, lo que unido a su constante de afinidad considerablemente baja hacen bastante verosímil la posibilidad de que una parte sustancial de la fructosa difosfato esté en forma ligada y por tanto no activa. La realidad de tal efecto se demuestra con los resultados de la tabla 19 en donde el paso de una concentración de aldolasa de significación fundamentalmente

TABLA 18

Concentración de sílfos ligantes para fructosa difosfato en hígado de rata<sup>a</sup>

Enzima	Actividad	Actividad molecular	Molaridad	Subunidades	Normalidad	Km 6 Ki
	(U/gr tejido)		( $\mu$ M)		( $\mu$ N)	( $\mu$ M)
Aldolasa	5 <sup>b</sup>	$4,6 \times 10^2$	11	4	44	2 <sup>e</sup>
Piruvato kinasa L	60 <sup>b</sup>	$8 \times 10^4$	1	(52) <sup>d</sup>	52	3 <sup>c</sup>
Fructosa difosfatasa	10 <sup>c</sup>	$1,6 \times 10^4$	0,6	4	2	0,7 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Los datos de los enzimas provienen de Barman (8) para la actividad molecular y de Barman (8) y de Kloiz y Darnall (70) para las subunidades. <sup>b</sup> Sillero y colab. (136). <sup>c</sup> Datos de esta tesis. <sup>d</sup> Peso molecular, 208.000 (152)  $\times$  1/40.000. El peso molecular medio de una subunidad es 40.000 (140). <sup>e</sup> Km para la dihidroxiacetona fosfato, 800  $\mu$ M y Km para el gliceraldehido 3-fosfato, 370  $\mu$ M. <sup>f</sup> Carbonell y colab. (20).

TABLA 19

Efecto de la adición de una cantidad estogulométrica de aldolasa sobre la activación de la piruvato kinasa de hígado de rata por fructosa difosfato

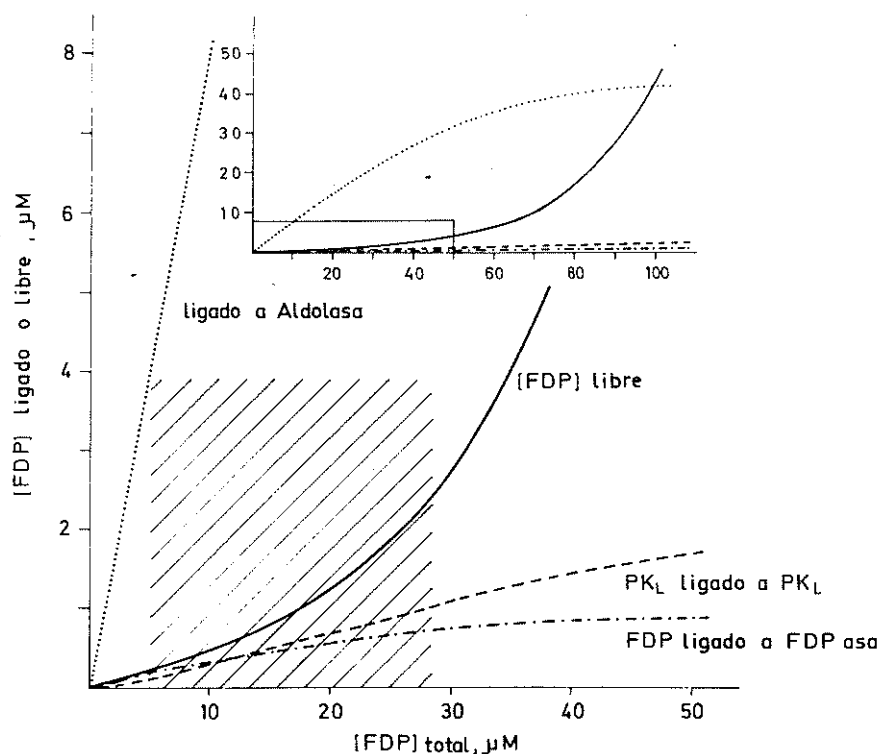
Actividad de piruvato kinasa µmoles de piruvato formado/min	
Sin fructosa difosfato	4
Sin aldolasa	80
+ 1 unidad de aldolasa (0,6 µM)	70
+50 unidades de aldolasa (30 µM)	20

Las cubetas de ensayo que contenían imidazol 50 mM, pH 7, KCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, fosfoenolpiruvato 0,1 mM, ADP 1 mM, alanina 2 mM, fructosa difosfato 10 µM y aldolasa en las cantidades indicadas, fueron preincubadas 15 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añadió DPNH y 5 µl de extracto crudo a 1/3 de hígado (centrifugado a 30.000 g durante 20 minutos, preincubado a 30 min. a temperatura ambiente y completamente sensibilizado a los inhibidores y activadores alostéricos), determinándose las velocidades iniciales.



catalítica a una concentración semejante a la existente en el citoplasma produce un descenso considerable en la activación de la piruvato kinasa por fructosa difosfato.

Si suponemos que las constantes de Michaelis de la tabla 18 representan aproximadamente las constantes de disociación de la fructosa difosfato por sus diferentes sitios ligantes se puede construir la figura 49 que representa cómo se reparte la fructosa difosfato total entre aquellos sitios. Como puede verse en esa figura la zona fisiológica de concentraciones de fructosa difosfato total corresponde a una zona de concentraciones libres de fructosa difosfato que no llegan a saturar la piruvato kinasa. En ese sentido un aumento en la actividad real de la fructosa difosfatasa parece el medio ideal de procurar la regulación de esta compleja red de encrucijadas, ya que como hemos mencionado más arriba la regulación de la producción de fosfoenolpiruvato por la fosfoenolpiruvato carboxikinasa está fuertemente interrelacionada con la regulación de la piruvato kinasa. La fructosa difosfatasa es un enzima alostérico para el que se han descrito una serie de efectos, inhibición por AMP (150), sensibilidad a portadores de grupos-SH (109), efecto de una proteína interaccionante (108) y otros efectos de inactivación y activación (75, 149), pero hasta este momento carecemos de un modelo explicativo a nivel ni siquiera cualitativo y mucho menos cuantitativo de la regulación de este enzima, ya que ninguno de los efectos mencionados, en la forma descrita, pueden dar cuenta de la regulación de este enzima en relación con todas estas encrucijadas.



**Fig. 49. Distribución calculada de la fructosa difosfato (FDP) entre fracciones ligadas y libre en el hígado de rata, a diferentes concentraciones de FDP total. Los cálculos se han hecho con los valores de la tabla 18, tomando como Ks los valores de K<sub>m</sub> ó K<sub>a</sub> y suponiendo que la unión de la fructosa difosfato sigue una cinética hiperbólica. De hecho la activación alostérica de la piruvato kinasa de hígado (PK<sub>L</sub>) presenta una cinética cooperativa (fig. 43) que si se tomase en cuenta aumentaría aún más la sigmoideidad de su curva de saturación sobre la que se representa en la figura. El área rayada indica el rango fisiológico de concentraciones de FDP total.**

Regulación conjunta de la gluconeogénesis y  
procesos metabólicos relacionados

En lo que antecede hemos discutido en forma escalonada el complejo proceso gluconeogénico que ocurre en el hígado y riñón de los organismos superiores. Vamos a discutir ahora de modo sucesivo, las posibles vías que recorren o entran en funcionamiento en el proceso gluconeogénico a partir de tres precursores: piruvato (Fig. 50), lactato (Fig. 51) y un aminoácido, alanina (Fig. 52). En estos modelos se han tenido en cuenta: 1) las vías que entran en funcionamiento, 2) el problema de la salida de oxalacetato de la mitocondria, 3) el suministro de poder reductor para la reducción del ácido 3-fosfoglicérico, 4) la salida de ATP para las sucesivas kinasas, 5) el equilibrio en el transporte y en la carga a través de la barrera mitocondrial, 6) los pasos regulados más importantes.

En la figura 50 se presenta la gluconeogénesis a partir de piruvato que empieza atravesando la barrera mitocondrial (no requiere transporte) pero que exigirá para guardar el equilibrio electrosmótico la salida de una molécula semejante, por ejemplo, un cuerpo cetónico que tampoco necesita transportador. El piruvato se carboxila y el oxalacetato se transforma a malato. El DPNH proviene de la oxidación de los ácidos grasos que a su vez dan energía para formar ATP, y que contribuyen a detener el ciclo de Krebs (a través de la doble rienda del ATP y TPNH). El malato sale de la mitocondria intercambiándose con el fosfato inorgánico y se deshidrogena a malato con lo cual se obtiene oxalacetato y potencial reductor. El oxalacetato a través



de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa que está aumentada en gluconeogénesis pasa a fosfoenolpiruvato que gracias a la inhibición de la piruvato kinasa puede seguir hasta glucosa. Quedan en este camino dos pasos fundamentales a comprender: la regulación de la fructosa difosfatasa y de la glucosa 6-fosfatasa.

En la figura 51 el poder reductor está ya asegurado a partir del lactato y el piruvato formado sigue inicialmente el mismo camino, pero posiblemente debe salir en forma de aspartato que intercambia con glutamato. El aspartato transamina para dar oxalacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato saldrá de la mitocondria intercambiándose con el malato que a su vez volverá a salir acoplado al fosfato inorgánico. A partir de este momento el camino del oxalacetato es el mismo de la figura anterior.

En la figura 52 se parte de dos moléculas de alanina, aunque podrían ser dos moléculas de otros aminoácidos. Una transamina fuera de la mitocondria y otra dentro. La de dentro (no sabemos nada del transporte de ese aminoácido a través de la membrana mitocondrial) dará piruvato que seguirá el camino descrito en la figura 50. El piruvato formado en la transaminación citoplasmática entrará y formará oxalacetato en la mitocondria y seguidamente transaminará a aspartato (por supuesto en la mitocondria probablemente no será posible distinguir entre ambas moléculas de piruvato). El aspartato sale intercambiándose con el glutamato (glutamato que equivale al formado en la transaminación citoplasmática de alanina a piruvato). Ese glutamato se va a desaminar dejando  $\alpha$ -cetoglutarato que sale para cerrar el ciclo de la transaminación citoplasmática y el amoníaco junto a  $\text{CO}_2$  va a dar carbamil fosfato que con la ornitina dará citrulina. Poco se sabe de los requerimientos de salida y entrada de estos





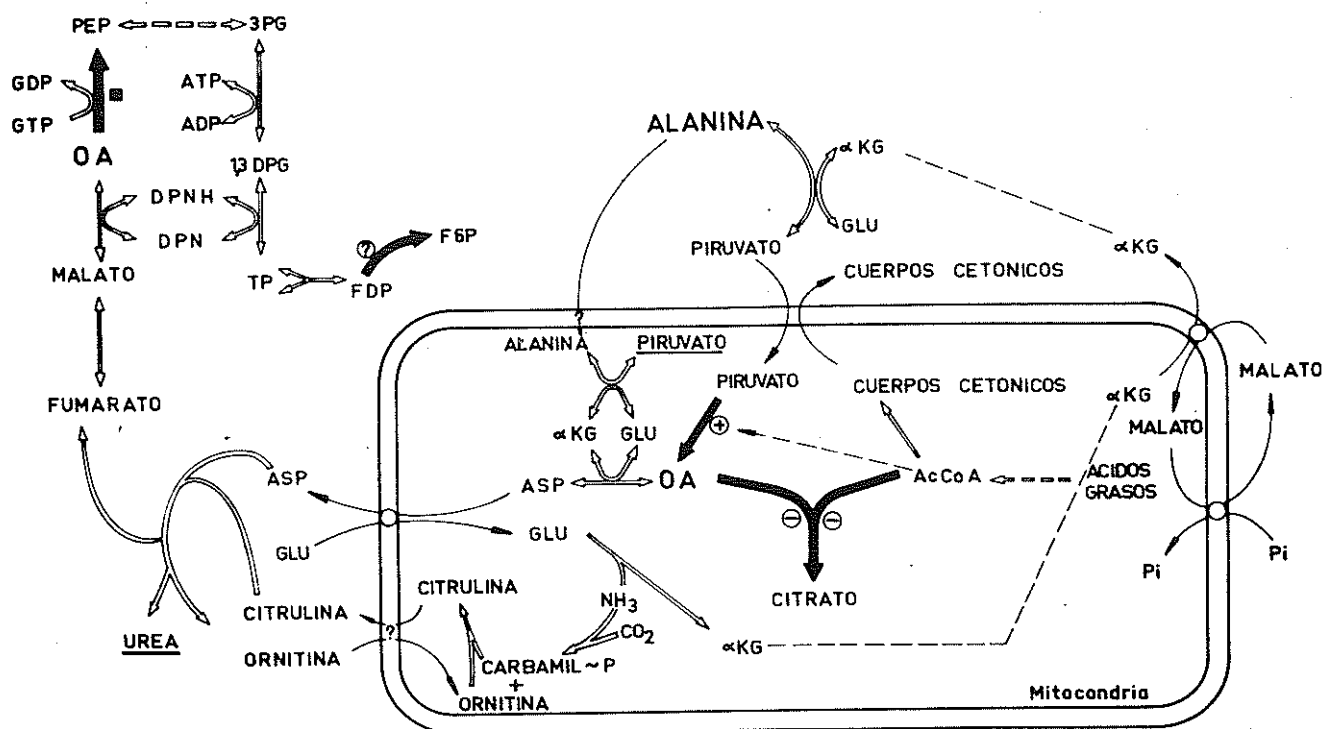


Fig. 52. Esquema de las interrelaciones de la gluconeogénesis a partir de ALANINA con otras vías metabólicas y compartimientos celulares. Para el significado de los distintos signos ver el plé de la figura 50.

metabolitos. El aspartato que ha salido de la mitocondria se introduce en el ciclo de la urea dando fumarato que dará malato y seguirá el mismo camino que en la figura 50.

Por supuesto, las reacciones e intercambios de estos tres esquemas no se realizan aisladamente sino que probablemente están ocurriendo simultáneamente en el interior de cada una de las células hepáticas, con la complejidad adicional de los otros aminoácidos que también intervienen en el proceso.

### Niveles superiores de Integración metabólica

Naturalmente que la situación es mucho más compleja aún en la realidad y que nos falta ligar todos estos mecanismos a nivel enzimático con los posibles mensajes interorgánicos hormonales y nerviosos que deben coordinar la función del organismo entero, pues aunque en la actualidad hemos adelantado muy considerablemente de la situación indicada por los párrafos de Lieben (81) escritos en 1935 con que encabezo esta tesis, no hay duda que su actitud general es totalmente válida aún hoy día: a) que sólo cuando seamos capaces de explicar o aplicar nuestros conocimientos a las situaciones patológicas, estaremos cerca de un conocimiento adecuado; b) la importancia crucial de los estímulos hormonales y nerviosos en la regulación de este proceso y c) la necesidad de una teoría comprehensiva de estos procesos. Evidentemente que la acción de los ácidos grasos estimulante de la gluconeogénesis (121, 155, 176) puede explicarse por su acción a nivel intramitocondrial (Fig. 50 y 51).

No ocurre lo mismo en cuanto al papel del glucagón que puede actuar en los siguientes niveles: 1) activación de la lipasa hepática (118) con aumento en los niveles de ácidos grasos; 2) estimulación (o aumento en los niveles) de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (37); 3) estimulación de la fructosa difosfatasa y 4) estimulación de la glucosa 6-fosfatasa. Ninguno de los tres últimos posibles efectos tiene explicación a nivel molecular, aunque el segundo podría explicarse si el AMPc regulase los niveles de fosfoenolpiruvato carboxikinasa (lo que no sería de extrañar, ya que este enzima está sujeto a represión catabólica por glucosa (tabla 8) y parece (102) que el AMPc está muy relacionado con este fenómeno). Sin embargo lo que se desconoce prácticamente en absoluto es la relación que esta hormona puede tener con los otros dos enzimas, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa, si es que tiene alguna.

La insulina puede jugar un papel interesante en este cuadro complejo, como acción antagónica del glucagón en el control de estos procesos metabólicos. Sus efectos (disminuyendo los niveles de AMPc (36)), sobre la glucokinasa (122) y periféricamente sobre el transporte de glucosa (114) tenderían a mantener una situación de utilización de glucosa y aumento de lipogénesis. Como se sabe que los niveles de glucagón e insulina varían inversamente en el ayuno y en la diabetes (110), sea cual sea el mecanismo molecular más importante por el que actúan, no hay duda que su acción sobre estos procesos es completamente sinérgica. El efecto de los corticosteroides sobre la gluconeogénesis y la glicólisis está lleno de oscuridades y datos contradictorios (126).

En el caso del sistema nervioso, los trabajos de Shimazu (130, 131) sólo hablan de una estimulación vegetativa de la fosforilasa y de la glucógeno sintetasa sin que haya ninguna prueba de que actúen a otros niveles. Este campo permanece pues casi virgen aunque no podemos olvidarlo en un comentario de conjunto.

Finalmente, sólo indicaremos que la regulación de otros dos procesos íntimamente relacionados con la gluconeogénesis y glicólisis permanece aún sin resolver completamente. El primero es el metabolismo de los ácidos grasos (síntesis-degradación) y el segundo la ureogénesis. No está aclarado el mecanismo por el que en el hígado se pasa de una situación de glicólisis-llipogénesis a otra de gluconeogénesis-oxidación de ac.grasos-cetogénesis. Esta transición estará estrechamente ligada con la disponibilidad de precursores, pero es ése el único factor responsable de su regulación? Algo muy semejante ocurre a nivel de la ureogénesis, en la que no se sabe si puede haber estímulos específicos que regulen esa vía o es sólo la disponibilidad de sustrato, amonlo fundamentalmente, el parámetro desencadenante de este proceso. Un tercer proceso cuyos posibles mecanismos de regulación permanecen aún sin aclarar es la proteólisis, íntimamente relacionada con el suministro de precursores gluconeogénicos.

## V. CONCLUSIONES

Se han estudiado las bases enzimáticas y la regulación de las encrucljadas metabólicas del oxalacetato y fosfoenolpiruvato. Para ello se abordó el análisis de la localización subcelular de los enzimas relacionados, es decir, de su compartimentación, para pasar posteriormente al estudio detallado de las propiedades de los distintos enzimas constituyentes de esas encrucljadas. Los resultados obtenidos se discuten en relación con los problemas de la regulación de la gluconeogénesis y de otros procesos metabólicos relacionados. Las principales conclusiones obtenidas son:

1a. La piruvato carboxilasa está localizada en la matriz mitocondrial.

2a. En el hígado de rata existen dos encrucljadas metabólicas del oxalacetato, una mitocondrial formada por la citrato sintasa, malato deshidrogenasa y glutámico oxalacético transaminasa, enzimas todas de la matriz mitocondrial y otra citoplasmática formada por la fosfoenolpiruvato carboxikinasa, malato deshidrogenasa y glutámico oxalacético transaminasa.

3a. La encrucljada metabólica del fosfoenolpiruvato tiene particular interés en gluconeogénesis por la localización semejante, citoplasmática, de la piruvato kinasa, enolasa y fructosa biscoatasa.

4a. Se han estudiado las propiedades cinéticas de la citrato sintasa, con un método específico desarrollado especialmente para ello, encontrándose una  $K_m$  muy baja para el oxalacetato y una inhibición por TPNH que puede jugar algún papel en la regulación del ciclo de Krebs en condiciones gluconeogénicas. Se han estudiado las características de los otros dos enzimas de la encrucljada mi-



mitocondrial del oxalacetato. Estas propiedades junto a sus características adaptivas permiten formular una hipótesis del posible funcionamiento de esta encruclijada en gluconeogénesis, en la que se insiste en el posible valor de las elevadas concentraciones molares (y normales) de los enzimas implicados existentes en la matriz mitocondrial.

5a. Se han estudiado las propiedades cinéticas de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa utilizando un método específico especialmente desarrollado al efecto, y no ha sido posible encontrar ningún efecto regulador a su nivel excepto un claro cambio de <sup>actividad</sup> ~~valor~~ cuando se pasa de condiciones glicolíticas a gluconeogénicas. Se han estudiado las propiedades cinéticas de los otros dos enzimas de la encruclijada citoplasmática del oxalacetato en hígado de rata. Estas propiedades y sus cambios adaptivos permiten formular una hipótesis de la regulación metabólica de dicha encruclijada.

6a. Se han estudiado con detalle las propiedades cinéticas y reguladoras de la piruvato kinasa de hígado y riñón de rata, habiéndose encontrado un claro efecto desensibilizador del frío que explica las dificultades que se habían tenido anteriormente para observar reproduciblemente propiedades presuntamente reguladoras de este enzima. Con enzima nativo se han estudiado las inhibiciones por ATP y alanina y la activación por fructosa-1,6-difosfato, cuyo efecto conjunto permite explicar cómo se regula la actividad de este enzima, impidiendo su interferencia con la gluconeogénesis.

En el esquema conjunto en que estos resultados se han integrado, se resaltan los problemas actualmente existentes en la regulación de la gluconeogénesis y procesos metabólicos relacionados, en particular la clara insuficiencia en nuestros conocimientos sobre la regulación de la fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa.

## VI. BIBLIOGRAFIA

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de  
ta fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral  
con la censura de Sobresaliente "cum laude"

Madrid, 19 de enero de 1971

F. Bustanza

Almudena

Alfonso

Jose

Sal

1. Angielski, S. y Szutowicz, A. "Tissue content of citrate and citrate-leavage enzyme activity during starvation and refeeding". Nature **213**, 1252-1253 (1967).
2. Annett, R.G. y Kosicki, G.W. "Oxalacetate keto-enol tautomerase. Purification and characterization". J. Biol. Chem. **244**, 2059-2067 (1969).
3. Atkinson, D.E. "Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism". En Metabolic Roles of Citrate (T.W. Goodwin, ed.) Academic Press, New York and London, 1968, p. 23-40.
4. Atkinson, D.E. "Regulation of enzyme function". Ann. Rev. Microbiol. **23**, 47-68 (1969).
5. Atkinson, D.E. y Walton, G.M. "Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme". J. Biol. Chem. **242**, 3239-3241 (1967).
6. Azzi, A., Chappell, J.B. y Robinson, B.H. "Penetration of the mitochondrial membrane by glutamate and aspartate". Biochem. Biophys. Res. Commun. **29**, 148-152 (1967).
7. Ballard, F.J. y Hanson, R.W. "Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver". Biochem. J. **104**, 866-871 (1967).
- 7a. Ballard, F.J., Hanson, R.W. y Reshef, L. "Immunochemical studies with soluble and mitochondrial pyruvate carboxylase activities from rat tissues". Biochem. J. **119**, 735-742 (1970).
8. Barman, T.E. Enzyme handbook. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1969, 2 vols.
9. Beattie, D.S. "The submitochondrial distribution of the fatty acid oxidizing system in rat liver mitochondria". Biochem. Biophys. Res. Commun. **30**, 57-62 (1968).
10. Bergmeyer, H.U. Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim/bergstr., 1963.
11. Bernhart, D.N. y Wreath, A.R. "Colorimetric determination of phosphorus by modified phosphomolybdate method". Anal. Chem. **27**, 440-441 (1955).
12. Böttger, I., Wieland, O., Erdlezka, D. y Pette, D. "Intracellular localization of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver". Eur. J. Biochem. **8**, 113-119 (1969).
13. Bowman, R.H. "Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney". J. Biol. Chem. **245**, 1604-1612 (1970).
14. Boyer, P.D. "Pyruvate kinase". En The Enzymes, 2nd ed. (P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrback, eds.), vol. 6. Academic Press, New York and London, 1962, p. 95-113.

15. Boyer, P.D. "The inhibition of pyruvate kinase by ATP: a  $Mg^{++}$  buffer system for use in enzyme studies". Biochem. Biophys. Res. Commun. **34**, 702-706 (1969).
16. Brdiczka, D., Pette, D., Brunner, G. y Miller, F. "Kompartimentierte Verteilung von Enzymen in Rattenlebermitochondrien". Eur. J. Biochem. **5**, 294-304 (1966).
17. Brunner, G. y Bygrave, F.L. "Microsomal marker enzymes and their limitations in distinguishing the outer membrane of rat liver mitochondria from the microsomes". Eur. J. Biochem. **8**, 530-534 (1969).
18. Bücher, Th., Krecji, K., Rüssmann, W., Schnitger, H. y Wessemann, W. "Metabolic assay in frozen samples of liver tissue". En Rapid mixing and sampling techniques in Biochemistry (B. Chance, R.H. Eisenhardt, Q.H. Gilson y K.K. Lonberg-holm, eds.) Academic Press, New York-London, 1964, p. 255-264.
19. Bücher, Th. y Pfeleiderer, G. "Pyruvate kinase from muscle". En Methods in Enzymology (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.) vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 435-440.
20. Carbonell, J., Marco, R., Llorente, P. y Sols, A. (en preparación), 1970.
21. Carminatti, H., Jiménez de Asúa, L., Recondo, E., Passeron, S. y Rozengurt, E. "Some kinetic properties of liver pyruvate kinase (type L)". J. Biol. Chem. **243**, 3051-3056 (1968).
22. Cazzulo, J.J., Sundaram, T.K. y Kornberg, H.L. "Mechanism of pyruvate carboxylase formation from the apoenzyme and biotin in a thermophilic bacillus". Nature **227**, 1103-1105 (1970).
23. Cleland, W.W., Thompson, V.W. y Barden, R.E. "Isocitrate dehydrogenase (TPN-specific) from pig heart". En Methods in Enzymology, vol. XIII (J.M. Lowenstein, ed.), Academic Press, New York-London, 1969, p. 30-33.
24. Chang, H. y Lane, M.D. "The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. II. Purification and properties of liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase". J. Biol. Chem. **241**, 2413-2420 (1966).
25. Chang, H., Maruyama, H., Miller, R.S. y Lane, M.D. "The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. III. Investigation of the kinetics and the mechanism of reaction of the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase-catalyzed reaction". J. Biol. Chem. **241**, 2421-2430 (1966).
26. Chappell, J.B. y Robinson, B.H. "Penetration of the mitochondrial membrane by tricarboxylic acid anions". En Metabolic roles of citrate (T.W. Goodwin, ed.), Academic Press, New York-London, 1968, p. 123-133.

27. Chen, R.F. y Plaut, G.W.E. "Activation and inhibition of DPN-linked isocitrate dehydrogenase of heart by certain nucleotides". Biochemistry **2**, 1023-1032 (1963).
28. Davidson, E.A. Techniques for paper strip counting in a scintillation spectrometer. Packard Technical Bulletin No. 4, 1962.
29. Davidson, E.H. Gene activity in early development. Academic Press, New York-London, 1968.
30. Dupourque, D. y Kun, E. "Malate dehydrogenases of ox kidney I. Isolation and properties of the mitochondrial enzyme". Eur. J. Biochem. **6**, 151-155 (1968).
31. De Duve, Ch. "The separation and characterization of sub-cellular particles". The Harvey Lectures **59**, 49-87 (1965).
32. Duve, C. de, Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. y Appelmann, F. "Tissue fraction studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue". Biochem. J. **60**, 604-617 (1955).
33. Eggleston, L.V. y Woods, H.F. "Activation of liver pyruvate kinase by fructose 1-phosphate". FEBS Letters **6**, 43-54 (1970).
34. England, P.J., Denton, R.M. y Randle, P.J. "The influence of magnesium ions and other bivalent metal ions on the aconitase equilibrium and its bearing on the binding of magnesium ions by citrate in rat heart". Biochem. J. **105**, 32c-33c (1967).
35. Epstein, W. y Beckwith, J.R. "Regulation of gene expression" Ann. Rev. Biochem. **37**, 411-436 (1968).
36. Exton, J.H., Jefferson, L.S., Butcher, R.W. y Park, C.R. "Gluconeogenesis in the perfused liver. The effects of fasting, alloxan diabetes, glucagon, epinephrine, adenosin 3',5' monophosphate and insulin". Am. J. Med. **40**, 709-715 (1966).
37. Exton, J.H. y Park, C.R. "Control of gluconeogenesis in liver. I. General features of gluconeogenesis in the perfused livers of rats". J. Biol. Chem. **242**, 2622-2632 (1967).
38. Exton, J.H. y Park, C.R. "Control of gluconeogenesis in liver. III. Effects of L-lactate, pyruvate, fructose, glucagon, epinephrine and adenosine 3',5' monophosphate in gluconeogenic intermediates in the perfused rat liver". J. Biol. Chem. **244**, 1424-1433 (1969).
39. Fantl, P., y Rome, M.N. "Dephosphorylation in liver extracts". Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. **23**, 20-29 (1945).
40. Felicioli, R.A. y Barsacchi, R. "The synthesis of phosphoenolpyruvate in the gluconeogenesis: the role of the enzyme mechanisms involved in transferring 4 C compounds across the mitochondrial membrane". Ital. J. Biochem. **XVI**, 331-337 (1966).

41. Felicioli, R.A., Barsacchi, R. e Ipata, P.L. "Chicken liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. Kinetic studies". Eur. J. Biochem. **13**, 403-409 (1970).
42. Foster, D.O., Lardy, H.A., Ray, P.D. y Johnston, J.B. "Alteration of rat liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activity by L-tryptophan in vivo and metals in vitro". Biochemistry **6**, 2120-2126 (1967).
43. Gelehrter, T., Motulsky, A.G. y Ommen, G.S. "Genetic control mechanisms in man and other mammals". Science **169**, 791-792 (1970).
44. Glanville, R., y Duys, C. de "Tissue fractionation studies. 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase and cathepsin by rat liver particles". Biochem. J. **59**, 433-443 (1955).
45. Glock, G.E. y McLean, P. "The intracellular distribution of pyridine nucleotides in rat liver". Exp. Cell Res. **11**, 234-236 (1956).
46. Goebell, H. y Kilgingenber, M. "DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase der Mitochondrien. I. Kinetische Eigenschaften, Vorkommen und Funktion der DPN-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase". Biochem. Z. **340**, 441-464 (1964).
47. Goebell, H. y Pette, D. "Die intrazelluläre Verteilung von DPN- und TPN-spezifischer Isocitrat-Dehydrogenase". Enzym. biol. clin. **8**, 161-175 (1967).
48. Gomori, G. "Hexosediphosphatase". J. Biol. Chem. **146**, 139-149 (1943).
49. Greville, G.D. "Pyruvate oxidation and the citrate cycle". En Carbohydrate metabolism and its disorders (F. Dickens, P.J. Randle y W.J. Whelan, eds.), vol. 1, Academic Press, New York-London, 1968, p. 297-334.
50. Grimm, F.C. y Doherty, D.G. "Properties of the two forms of malic dehydrogenase from beef heart". J. Biol. Chem. **236**, 1960-1965 (1961).
51. Gul, B. y Diels, R. "Pyruvate carboxylase in lactating rat and rabbit mammary gland". Biochem. J. **111**, 263-271 (1969).
52. Haan, E.J. de y Oestreicher, A.B. "Control of the reactions of intramitochondrially generated oxaloacetate". Abstr. FEBS 5th Meet. Prague, 1968, p. 52.
53. Haackel, R., Hess, B., Lauterborn, W. y Wüster, K.-H. "Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase". Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **349**, 699-714 (1968).



54. Harris, E.J. "Control of cation and anion transport in mitochondria". Abstr. 8th Intern. Congress Biochem. Switzerland 1970, p. 242-246.
55. Haslam, J.M. y Griffiths, D.E. "Factors affecting the translocation of oxaloacetate and L-malate into rat liver mitochondria". Biochem. J. **109**, 921-928 (1968).
56. Haslam, J.M. y Krebs, H.A. "The permeability of mitochondria to oxaloacetate and malate". Biochem. J. **107**, 659-667 (1968).
57. Hathaway, J.A. y Atkinson, D.E. "Kinetics of regulatory enzymes effect of adenosine triphosphate on yeast citrate synthase". Biochem. Biophys. Res. Commun. **20**, 661-665 (1965).
58. Hearst, J.E. y Botchan, M. "The eukaryotic chromosome". Ann. Rev. Biochem. **39**, 151-182 (1970).
59. Henning, H.V., Stumpf, B., Ohly, B. y Seubert, W. "On the mechanism of gluconeogenesis and its regulation. III. The gluconogenic capacity and the activities of pyruvate carboxylase and PEP-carboxylase of rat kidney and rat liver after cortisol treatment and starvation". Biochem. Z. **344**, 274-288 (1966).
60. Henson, C.P. y Cleland, W.W. "Kinetic studies of glutamic oxaloacetic transaminase isozymes". Biochemistry **3**, 338-345 (1964).
61. Hess, B., Haackel, R. y Brand, K. "FDP-activation of yeast pyruvate kinase". Biochem. Biophys. Res. Commun. **24**, 824-831 (1966).
62. Holten, D.D. y Nordlie, R.C. "Comparative studies of catalytic properties of guinea pig liver intra- and extramitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinases". Biochemistry **4**, 723-731 (1965).
63. Holzer, H. "Regulation of enzymes by enzyme-catalyzed chemical modification". Adv. Enzymol. **32**, 297-326 (1969).
64. Jacob, F. y Monod, J. "Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins". J. Mol. Biol. **3**, 318-356 (1961).
65. Jangaard, N.O., Unkeless, J. y Atkinson, D.E. "The inhibition of citrate synthase by adenosine triphosphate". Biochim. Biophys. Acta **151**, 225-235 (1968).
66. Johnson, D.C., Ebert, K.A. y Ray, P.D. "Hepatic gluconeogenesis of the rabbit". Biochem. Biophys. Res. Commun. **39**, 750-756 (1970).
67. Kastenschmidt, L.L., Kastenschmidt, J. y Helmreich, E. "The effect of temperature on the allosteric transitions of rabbit skeletal muscle phosphorylase b". Biochemistry **7**, 4548-4556 (1968).
68. Keech, D.B. y Utter, M.F. "Pyruvate carboxylase. II. Properties". J. Biol. Chem. **238**, 2609-2614 (1963).

69. Klingenberg, M. "Mitochondria metabolite transport". FEBS Letters **6**, 145-154 (1970).
70. Klotz, I.M. y Darnall, D.W. "Protein subunits: a table (second edition)". Science **166**, 126-128 (1969).
71. Kornberg, A. y Fricer, W.E. "Di- and triphosphopyridine nucleotide isocitric dehydrogenases in yeast". J. Biol. Chem. **189**, 123-136 (1951).
72. Kornberg, H.L. "Anaplerotic sequences and their role in metabolism". En Essays in Biochemistry (P.N. Campbell y G.D. Greville, eds.) vol. 2. Academic Press, New York - London, 1966, p. 1-31.
73. Koshland, D.E. Jr. y Neet, K.E. "The catalytic and regulatory properties of enzymes". Ann. Rev. Biochem. **37**, 359-410 (1968).
74. Kosicki, G.W. y Lee, L.P.K. "Effect of divalent metal ions on nucleotide inhibition of pig heart citrate synthetase". J. Biol. Chem. **241**, 3571-3574 (1966).
75. Kratowich, W. y Mendicino, J. "Role of enzyme-enzyme interactions in the regulation of gluconeogenesis. Effect of fatty acids, tricarboxylic acid cycle intermediates, and dinitrophenol on the rate of inactivation on D-fructose 1,6-diphosphatase by kidney mitochondria". J. Biol. Chem. **245**, 2483-2492 (1970).
76. Krebs, H.A. "Gluconeogenesis". Proc. Roy. Soc. (B) **159**, 545-564 (1964).
77. Krebs, H.A. y Veech, R.L. "Equilibrium relations between pyridine nucleotides and adenine nucleotides and their roles in the regulation of metabolic processes". Adv. Enzyme Regulation **7**, 397-413 (1969).
78. Kun, E. "Malate dehydrogenases". En The Enzymes (P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck, eds.), vol. 7, Academic Press, New York, 1963, p. 149-175.
79. Lardy, H.A. "Gluconeogenesis: pathways and hormonal regulation". The Harvey Lectures **60**, 261-278 (1966).
80. Lardy, H., Veneziale, C. y Gabrielli, F. "Paths of carbon in gluconeogenesis". En Metabolic Regulation and Enzyme Action (A. Sols y S. Grisolia, eds.), Academic Press, New York - London, 1970, p. 55-62.
81. Lieben, F. Geschichte der physiologischen Chemie. Franz Deutickes, Leipzig und Wien, 1935.
- 81a. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". J. Biol. Chem. **193**, 265-275 (1951).

82. Mahler, H.R. y Cordes, E.H. Biological Chemistry. Harper & Row, New York, 1966.
83. Mann, K.G. y Vestling, C.S. "Subunits of rat liver mitochondrial malate dehydrogenase". Biochemistry **8**, 1105-1109 (1969).
- 83a. Marco, R., Sebastián, J. y Sols, A. "Location of the enzymes of the oxalacetate metabolic cross-roads in rat liver mitochondria". Biochem. Biophys. Res. Commun. **34**, 725-730 (1969).
84. Marliss, E., Aoki, T.T., Felig, P., Pozepsky, T. y Cahill, G.F. Jr. "Hormones and substrates in the regulation of gluconeogenesis in fasting man". Adv. Enzyme Regulation **8**, 3-11 (1970).
85. Martin, B.R. y Denton, R.M. "The intracellular localization of enzymes in white adipose tissue fat-cells and permeability properties of fat-cell mitochondria. Transfer of acetyl units and reducing power between mitochondria and cytoplasm". Biochem. J. **117**, 861-877 (1970).
86. McBrien, D.C.H. y Moses, V. "Compartmentation of the metabolism of lactose, galactose, and glucose in Escherichia coli". J. Gen. Microbiol. **51**, 159-172 (1968).
87. McGivan, J.D., Bradford, N.M. y Chappell, J.B. "The inhibition of 2-oxoglutarate entry into rat liver mitochondria by L-aspartate". FEBS Letters **4**, 247-250 (1969).
88. Metzner, H. "Papierchromatographische Trennung der Photosynthese-Intermediärprodukte". Naturwiss. **49**, 183 (1962).
89. Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J.-P. "On the nature of allosteric transitions: a plausible model". J. Mol. Biol. **12**, 88-118 (1965).
90. Morino, Y., Itoh, H. y Wada, H. "Crystallization of 2-oxoglutarate L-aspartate transaminases from mitochondrial and soluble fractions". Biochem. Biophys. Res. Commun. **13**, 348-352 (1963).
91. Newsholme, E.A. y Gevers, W. "Control of glycolysis and gluconeogenesis in liver and kidney cortex". Vitamins and Hormones **25**, 1-87 (1967).
92. Nicholls, D.G. y Garland, P.B. "The control of isocitrate oxidation by rat liver mitochondria". Biochem. J. **114**, 215-225 (1969).
93. Nordlie, R.C. y Aron, W.J. "Glucose 6-phosphatase". En Methods In Enzymology (W.A. Wood, ed.), vol. IX. Academic Press, New York-London, 1966, p. 619-625.
94. Nordlie, R.C. y Lardy, H.A. "Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities". J. Biol. Chem. **238**, 2259-2263 (1963).

95. Ochoa, S. "Crystalline condensing enzyme from pig heart". En Methods in Enzymology (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.), vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 685-694.
96. Ochoa, S. "Malic dehydrogenase from pig heart". En Methods in Enzymology (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.), vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 735-739.
97. Owen, O.E., Morgan, A.P., Kemp, H.G., Sullivan, J.M., Herrera, M.G. y Cahill, G.F. Jr. "Brain metabolism during fasting". J. Clin. Invest. **46**, 1589-1595 (1967).
98. Pande, S.V. y Mead, J.F. "Long chain fatty acid activation in subcellular preparations from rat liver". J. Biol. Chem. **243**, 352-361 (1968).
99. Pardee, A.B. y Beckwith, J.R. "Control of constitutive enzyme synthesis". En Informational macromolecules (H.J. Vogel, V. Bryson y J.O. Lampen, eds.), Academic Press, New York - London, 1963, p. 255-269.
100. Pardee, A.B. y Potter, V.R. "Inhibition of succinic dehydrogenase by oxalacetate". J. Biol. Chem. **175**, 1085-1094 (1948).
101. Passeron, S., Jiménez de Asúa, L. y Carminatti, H. "Fructose 1,6-diphosphate, a reactivator of  $\text{Cu}^{++}$ -inhibited pyruvate kinase". Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**, 33-38 (1967).
102. Pastan, I. y Perlman, R. "Cyclic adenosine monophosphate in bacteria". Science **169**, 339-344 (1970).
103. Pette, D. "Mitochondrial enzyme activities". En Regulation of metabolic Processes in Mitochondria (J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello y E.C. Slater, eds.), Elsevier, Amsterdam-London-New York, 1966, p. 28-48.
104. Pfaff, E., Klingenberg, M., Ritt, E. y Vogell, W. "Korrelation des unspezifisch permeablen mitochondrialen Raumes mit dem "Intermembran-Raum"". Eur. J. Biochem. **5**, 222-232 (1968).
105. Phillips, A.H. y Langdon, R.G. "Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization and kinetic studies". J. Biol. Chem. **237**, 2652-2660 (1962).
106. Pitot, H.C., Potter, V.R. y Morris, H.P. "Metabolic adaptations in rat hepatomas. The effect of dietary protein on some inducible enzymes in liver and hepatoma 5123". Cancer Res. **21**, 1001-1008 (1961).
107. Plaut, G.W.E. "Isocitrate dehydrogenase (DPN-specific) from bovine heart". En Methods in Enzymology (J.M. Lowenstein, ed.) vol. XIII, Academic Press, New York - London, 1969, p. 34-42.

108. Pogell, B.M., Tanaka, A. y Siddons, R.C. "Natural activators for liver fructose 1,6-diphosphatase and the reversal of adenosine 5'-monophosphate inhibition by muscle phosphofructokinase". J. Biol. Chem. **243**, 1356-1367 (1968).
109. Pontremoli, S., Tranfoglio, S., Enser, M., Shapiro, S. y Herecker, B.L. "Regulation of fructose diphosphatase activity by disulfide exchange". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. **58**, 286-293 (1967).
110. Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A., Denton, R.M. y Fogson, C.I. "Interactions of metabolism and the physiological role of insulin". Recent Progr. Hormone Res. **22**, 1-44 (1966).
111. Raval, D.N. y Wolfe, R.G. "Malic dehydrogenase. II. Kinetic studies of the reaction mechanism". Biochemistry **1**, 263-269 (1962).
112. Raval, D.N. y Wolfe, R.G. "Malic dehydrogenase. III. Kinetic studies of the reaction mechanism by product inhibition". Biochemistry **1**, 1112-1117 (1962).
113. Raval, D.N. y Wolfe, R.G. "Malic dehydrogenase. IV. pH dependence of the kinetic parameters". Biochemistry **1**, 1118-1123 (1962).
114. Renold, A.E. "The mechanism of insulin action: attempt at synthesis". En Handbuch des Diabetes mellitus (E.F. Pfeiffer, ed.) J.F. Lehmanns Verlag, München 1969, p. 553-568.
115. Reshef, L., Hanson, R.W. y Ballard, F.J. "Glyceride-glycerol synthesis from pyruvate. Adaptive changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in adipose tissue and liver". J. Biol. Chem. **244**, 1994-2001 (1969).
116. Reynard, A.M., Hass, L.F., Jacobsen, D.D. y Boyer, P.D. "The correlation of reaction kinetics and substrate binding with the mechanism of pyruvate kinase". J. Biol. Chem. **236**, 2277-2283 (1962).
117. Robinson, B.H., Williams, G.R., Halperin, M.L. y Leznoff, C.C. "The effects of 2-ethylcitrate and tricarballic acid on citrate transport in rat liver mitochondria and fatty acid synthesis in rat white adipose tissue". Eur. J. Biochem. **15**, 263-272 (1970).
118. Robinson, G.A., Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. "Cyclic AMP". Ann. Rev. Biochem. **37**, 149-174 (1968).
119. Rognstad, R. y Katz, J. "Gluconeogenesis in the kidney cortex. Effects of D-malate and amino-oxyacetate". Biochem. J. **116**, 483-491 (1970).

120. Roodyn, D.B. Enzyme cytology. Academic Press, New York-London, 1967.
121. Ross, B.D., Hems, R. y Krebs, H.A. "The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver". Biochem. J. **102**, 942-951 (1967).
122. Salas, M., Viñuela, E. y Sols, A. "Insulin-dependent synthesis of liver glucokinase in the rat". J. Biol. Chem. **238**, 3535-3538 (1963).
123. Sapag-Hagar, M., Marco, R. y Sols, A. "Distribution of hexokinase and glucokinase between parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver". FEBS Letters **3**, 68-71 (1969).
124. Schimke, R.T. "On the roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels in mammalian tissues". En Current topics in cellular regulation (B.L. Horacker y E.R. Stadtman, eds.) vol. I, Academic Press, New York - London, 1970, p. 77-124.
125. Schimke, R.T. y Doyle, D. "Control of enzyme levels in animal tissues". Ann. Rev. Biochem. **39**, 929-976 (1970).
126. Scrutton, M.C. y Uitter, M.F. "The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues". Ann. Rev. Biochem. **37**, 249-302 (1968).
127. Seubert, W., Henning, H.V., Schoner, W. y L'Age, M. "Effects of cortisol on the levels of metabolites and enzymes controlling glucose production from pyruvate". Adv. Enzyme Regulation **6**, 153-180 (1968).
128. Shepherd, D. y Garland, P.B. "ATP controlled acetoacetate and citrate synthesis by rat liver mitochondria oxidising palmitoyl-carnitine, and the inhibition of citrate synthase by ATP". Biochem. Biophys. Res. Commun. **22**, 89-93 (1966).
129. Shepherd, D. y Garland, P.B. "The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria". Biochem. J. **114**, 597-610 (1969).
130. Shimazu, T. "Glycogen synthetase activity in liver: regulation by the autonomic nerves". Science **156**, 1256-1257 (1967).
131. Shimazu, T. y Amakawa, A. "Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nerve system. III. Differential effects of sympathetic-nerve stimulation and of catecholamines on liver phosphorylase". Biochim. Biophys. Acta **165**, 349-356 (1968).
132. Shrago, E., Glennon, J.A. y Gordon, E.S. "Studies on enzyme concentration and adaptation in human liver and adipose tissue". J. Clin. Endoc. **27**, 679-685 (1967).



133. Shrago, E. y Lardy, H.A. "Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis. II. Conversion of precursors to phosphoenolpyruvate in liver cytosol". J. Biol. Chem. **241**, 663-668 (1966).
134. Siegel, L. y England, S. "Beef-heart malic dehydrogenases. I. Properties of the enzyme purified from extracts of acetone-dried powders". Biochim. Biophys. Acta **54**, 67-76 (1961).
135. Sillero, A., Sillero, M.A.G. y Sols, A. "Regulation of the level of key enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in liver". Eur. J. Biochem. **10**, 351-354 (1969).
136. Sillero, M.A.G., Sillero, A. y Sols, A. "Enzymes involved in fructose metabolism in liver and the glyceraldehyde metabolic crossroads". Eur. J. Biochem. **10**, 345-350 (1969).
137. Sizer, I.W. y Jenkins, W.T. "Glutamic aspartic transaminases from pig ventricles". En Methods In Enzymology (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.) vol. V, Academic Press, New York, 1962, p. 677-684.
138. Stein, M.W. "Phosphohexoisomerases from muscle". En Methods In Enzymology (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.) vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 304-306.
139. Sols, A., Gancedo, C. y DelaFuente, G. "Energy-yielding metabolism in yeast". En The Yeasts (A.H. Rose y J.S. Harrison, eds.) vol. 2, Academic Press, New York - London, p. 701-737, en prensa.
140. Sols, A. y Marco, R. "Concentrations of metabolites and binding sites. Implications in metabolic regulation". En Current topics in cellular regulation (B.L. Horecker y E.R. Stadtman, eds.) vol. 2, Academic Press, New York - London, en prensa.
141. Sollocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. y Bergstrand, A. "Separation and some enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria". En Methods In Enzymology (R.W. Estabrook y M.E. Pullman, eds.) vol. X, Academic Press, New York - London, 1967, p. 448-463.
142. Sollocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. y Bergstrand, A. "An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria". J. Cell Biol. **32**, 415-438 (1967).
143. Srere, P.A. "Palmitoyl-Coenzyme A inhibition of the citrate-condensing enzyme". Biochim. Biophys. Acta **106**, 445-455 (1965).
144. Start, C. y Newsholme, E.A. "The effects of starvation and alloxan-diabetes on the contents of citrate and other metabolic intermediates in rat liver". Biochem. J. **107**, 411-415 (1968).

145. Stein, A.M., Stein, J.H. y Kirkman, S.K. "Diphosphopyridine nucleotide specific isocitric dehydrogenase of mammalian mitochondria. I. On the roles of pyridine nucleotide transhydrogenase and the isocitric dehydrogenases in the respiration of mitochondria of normal and neoplastic tissues". Biochemistry **6**, 1370-1379 (1967).
146. Susor, W.A. y Rutter, W.J. "Some distinctive properties of pyruvate kinase purified from rat liver". Biochem. Biophys. Res. Commun. **30**, 14-20 (1968).
147. Swanson, M.A. "Phosphatases of liver. I. Glucose 6-phosphatase". J. Biol. Chem. **184**, 647-659 (1950).
148. Tabor, C.W., Tabor, H. y Rosenthal, S.M. "Purification of amino oxidase from beef plasma". J. Biol. Chem. **208**, 645-661 (1954).
149. Taketa, K. y Pogell, B.M. "Reversible inactivation and inhibition of liver fructose 1,6-diphosphatase by adenosine nucleotides". Biochem. Biophys. Res. Commun. **12**, 229-235 (1963).
150. Taketa, K. y Pogell, B.M. "Allosteric inhibition of rat liver fructose 1,6-diphosphatase by adenosine 5'-monophosphate". J. Biol. Chem. **240**, 651-662 (1965).
151. Taketa, K. y Pogell, B.M. "The effect of palmityl coenzyme A on glucose 6-phosphate dehydrogenase and other enzymes". J. Biol. Chem. **241**, 720-726 (1966).
152. Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F. y Morimura, H. "Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues". J. Biochem. (Tokyo) **62**, 71-91 (1967).
153. Tanaka, T., Sue, F. y Morimura, H. "Feed-forward activation and feed-back inhibition of pyruvate kinase type L of rat liver". Biochem. Biophys. Res. Commun. **29**, 444-449 (1967).
154. Taylor, C.B. y Bailey, E. "Activation of liver pyruvate kinase by fructose 1,6-diphosphate". Biochem. J. **102**, 32c-33c (1967).
155. Teufel, H., Menahan, L.A., Shipp, J.C., Böning, S. y Wieland, O. "Effect of oleic acid on the oxidation and gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver". Eur. J. Biochem. **2**, 162-166 (1967).
156. Tiedale, H.D. "Preparation and properties of succinic-cytochrome c reductase". En Methods In Enzymology (R.W. Estabrook y M.E. Pullman, eds.) vol. X, Academic Press, New York - London, 1967, p. 213-215.

157. Threllfall, C.J. y Heath, D.F. "Compartmentation between glycolysis and gluconeogenesis in rat liver". Biochem. J. **110**, 303-312 (1966).
158. Utter, M.F. "Pyruvate carboxylase". En Metabolic Regulation and Enzyme Action (A. Sols y S. Grisolia, eds.), Academic Press, New York-London, 1970, p. 91-98.
159. Utter, M.F. y Keech, D.B. "Formation of oxalacetate from pyruvate and  $\text{CO}_2$ ". J. Biol. Chem. **235**, PC17-PC18 (1960).
160. Utter, M.F. y Keech, D.B. "Pyruvate carboxylase. I. Nature of the reaction". J. Biol. Chem. **238**, 2603-2606 (1963).
161. Utter, M.F. y Kurahashi, K. "Purification of oxalacetic carboxylase from chicken liver". J. Biol. Chem. **207**, 787-802 (1954).
162. Velick, S.F. y Vavra, J. "Glutamic-oxalacetate transaminase". En The Enzymes (P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrback, eds.), vol. VI, Academic Press, New York-London, 1962, p. 219-246.
163. Wagle, S.R. "Effects of biotin deficiency on pyruvate metabolism". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **121**, 15-19 (1966).
164. Walter, P., Paetkau, V. y Lardy, H.A. "Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis. III. The role and regulation of mitochondrial processes involved in supplying precursors of phosphoenolpyruvate". J. Biol. Chem. **241**, 2523-2532 (1966).
165. Weber, G., Lea, M.A. y Stamm, N.B. "Sequential feedback inhibition and regulation of liver carbohydrate metabolism through control of enzyme activity". Adv. Enzyme Regulation **6**, 101-123 (1966).
166. Weiss, G., Ohly, B., Brod, H. y Seubert, W. "On the intracellular location of pyruvate carboxylase". Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **351**, 265 (1970).
167. Weltzman, P.D.J. "Regulation of citrate synthase activity in *Escherichia coli*". Biochim. Biophys. Acta **126**, 213-215 (1966).
168. Weltzman, P.D.J. y Donmore, P. "Regulation of citrate synthase activity by  $\alpha$ -ketoglutarate. Metabolic and taxonomic significance". FEBS Letters **3**, 265-266 (1969).
169. Wharton, D.C. y Tzagoloff, A. "Cytochrome oxidase from beefheart mitochondria". En Methods in Enzymology (R.W. Estabrook y M.E. Pullman, eds.) vol. X, Academic Press, New York-London, 1967, p. 245-260.
170. Wieland, O. "Ketogenesis and its regulation". Adv. Metabolic Disorders **3**, 1-47 (1966).

171. Wieland, O. y Weiss, L. "Inhibition of citrate-synthase by palmityl-Coenzyme A". Biochem. Biophys. Res. Commun. **13**, 26-31 (1963).
172. Williamson, D.H., Lopes-Vieira, O. y Walker, B. "Concentrations of free glucogenic amino acids in livers of rats subjected to various metabolic stresses". Biochem. J. **104**, 497-502 (1967).
173. Williamson, D.H., Lund, P. y Krebs, H.A. "The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver". Biochem. J. **103**, 514-527 (1967).
174. Williamson, J.R. "Mechanism for the stimulation in vivo of hepatic gluconeogenesis by glucagon". Biochem. J. **101**, 11c-14c (1966).
175. Williamson, J.R., Browning, E.T. y Olson, M.S. "Interrelations between fatty acid oxidation and the control of gluconeogenesis in perfused rat liver". Adv. Enzyme Regulation **6**, 67-100 (1968).
176. Williamson, J.R., Browning, E.T., Scholz, R., Kreisberg, R.A. y Fritz, I.B. "Inhibition of fatty acid stimulation of gluconeogenesis by (+)-decanoylcarnitine in perfused rat liver". Diabetes **17**, 194-208 (1968).
177. Williamson, J.R. y Krebs, H.A. "Acetoacetate as fuel of respiration in the perfused rat heart". Biochem. J. **80**, 540-547 (1961).
178. Wright, J.A., Maeba, P. y Sanwal, B.D. "Allosteric regulation of the activity of citrate synthetase of Escherichia coli by  $\alpha$ -ketoglutarate". Biochem. Biophys. Res. Commun. **29**, 34-38 (1967).
179. Young, Y.W., Shrago, E. y Lardy, H.A. "Metabolic control of enzymes involved in lipogenesis and gluconeogenesis". Biochemistry **3**, 1687-1692 (1964).